

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTRATÉGIAS DE CULTIVO DE CÉLULAS DE
PIMENTA LONGA (*PIPER HISPIDINERVIUM*) E
DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS**

Tese submetida à Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lorena Benathar Ballod
Tavares

RITA DE CÁSSIA SIQUEIRA CURTO VALLE

FLORIANÓPOLIS, MARÇO DE 2003

AGRADECIMENTOS

Ao meu Marido, José Alexandre, pelo companheirismo, paciência, amizade, apoio, e, acima de tudo pelo seu amor.

Aos meus pais, Antonio e Bernadete, que com seu carinho, sempre tiveram uma palavra de estímulo e incentivo.

Aos meus irmãos Kleber e Guto pela força, atenção e por estarem sempre presentes nos momentos necessários.

À professora Lorena, pela orientação, amizade e carinho demonstrado ao longo dos anos de trabalho.

Ao prof. Agenor Furigo Jr., pela sua orientação e por acreditar que seria capaz de realizar a tese num tema tão novo. Agradeço também, por estar sempre disponível.

A Universidade Regional de Blumenau por ter possibilitado a execução deste trabalho, principalmente no nome da Profa. Lorena Benathar Ballod Tavares e Profa. Griseldes Fredel Boos.

Ao pessoal do Departamento de Engenharia Química da Universidade Regional de Blumenau que com sua amizade sempre me deu uma força.

Às minhas amigas Márcia (Ídala), Gisele (Baleia) e Karen (Prefeita) por terem sempre um tempinho para me ouvir e dar uma palavra de apoio e carinho, obrigadão.

Aos profs. Gilmar, Regina, Marcelo e Tito Lívio por aceitarem revisar este trabalho e participar da banca de defesa desta tese.

Aos professores Clayton Debiasi e Rosete Pescador agradeço pela valiosa contribuição para a execução da parte experimental deste trabalho.

Aos profs. do curso de Pós-graduação da Engenharia Química e da Biotecnologia, pelo conhecimento transmitido.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, em especial ao Edivilson, secretário do CPGENQ, pelo atendimento e simpatia durante o convívio.

A todos os amigos que, embora não citados, foram importantes durante o trajeto percorrido.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E acima de tudo a **Deus**.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
GLOSSÁRIO.....	vi
NOMENCLATURA.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 – REINO VEGETAL.....	4
2.1.1 – PIMENTA LONGA E SAFROL.....	5
2.2 – CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS COMO FONTE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	9
2.2.1 – FATORES DO AMBIENTE QUE INFLUENCIAM A CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS.....	14
2.2.1.1 – MEIO DE CULTURA.....	14
2.2.1.2 – TEMPERATURA.....	22
2.2.1.3 – AGITAÇÃO E PROJETO DE BIORREATORES.....	22
2.2.1.4 – AERAÇÃO.....	23
2.2.1.5 – INTENSIDADE LUMINOSA E FOTOPERÍODO.....	25
2.2.1.6 – POTENCIAL OSMÓTICO.....	26
2.2.1.7 – PH.....	27
2.2.1.8 – DENSIDADE CELULAR.....	27
2.2.1.9 – MEIO CONDICIONADO.....	28
2.2.2 – ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE PLANTAS.....	28
2.2.2.1 – ELICITORES.....	31
2.2.2.1 – SACAROSE.....	34
2.3 – ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS.....	36
2.4 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS VEGETAIS.....	37
2.5 – BIORREATORES.....	39

CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	44
3.2 – ESTUDO DA VIABILIDADE GERMINATIVA <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE PIMENTA LONGA.....	45
3.2.1 – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE SECAGEM E ARMAZENAMENTO SOB A VIABILIDADE GERMINATIVA.....	45
3.2.2 – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TEOR DE UMIDADE E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DAS ESPIGUETAS SOB A VIABILIDADE GERMINATIVA DAS SEMENTES.....	48
3.3 – OTIMIZAÇÃO DO USO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO PARA A FORMAÇÃO DE MASSA CELULAR.....	49
3.4 – ENSAIOS EM MEIO LÍQUIDO.....	53
3.4.1 – ESTRATÉGIA PARA MEDIDA DE MASSA CELULAR.....	53
3.4.2 – ENSAIOS EM FRASCOS AGITADOS.....	54
3.4.2.1 - ENSAIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE SACAROSE.....	54
3.4.2.2 - DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO.....	55
3.4.3. – ENSAIOS EM BIORREACTORES AERADOS.....	55
3.4.3.1 – MEIO DE CULTIVO.....	56
3.4.3.2 – BIORREATOR.....	56
3.5 – MÉTODOS ANALÍTICOS.....	59
3.5.1 – DETERMINAÇÃO DA MASSA CELULAR.....	59
3.5.2 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS TOTAIS.....	59
3.5.3 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS.....	60
3.5.4 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE.....	61
3.5.5 – DETERMINAÇÃO DE SAFROL.....	61
3.5.6 – DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	63
3.5.5 – DETERMINAÇÃO DE PH.....	64
3.6 - CÁLCULO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DO PROCESSO.....	64
3.6.1 - CÁLCULO DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS.....	64
3.6.2 - CÁLCULO DE PRODUTIVIDADE EM CÉLULA (P_X)	64
3.6.3 - CÁLCULO DOS TEMPO DE DUPLICAÇÃO (t_d).....	65
3.6.4 - CÁLCULO DAS VELOCIDADES DE CONSUMO DE SUBSTRATO (r_s).....	65
3.6.5 - CÁLCULO DOS FATORES DE CONVERSÃO.....	66
3.6.5.1 - FATOR DE CONVERSÃO DE CARBOIDRATOS EM CÉLULA ($Y_{X/S}$) DOS CULTIVOS EM <i>SHAKER</i> COM DETERMINAÇÃO DE CURVA DE CRESCIMENTO.....	66

3.6.5.2 - FATOR DE CONVERSÃO DE CARBOIDRATOS EM CÉLULA ($Y_{x/s}$) DOS CULTIVOS EM SHAKER COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE	66
3.6.7 - CÁLCULO DOS ÍNDICES DE CRESCIMENTO.....	67
CAPÍTULO IV – ESTUDOS PRELIMINARES.....	68
4.1 - ARTIGO I - ESTUDO DA SECAGEM DE ESPIGUETAS DE PIMENTA LONGA (<i>PIPER HISPIDINERVIUM</i>).....	69
4.2 - ARTIGO II - INFLUÊNCIA DAS TEMPERATURAS DE SECAGEM E ARMAZENAMENTO SOBRE A VIABILIDADE GERMINATIVA DE SEMENTES DE PIMENTA LONGA (<i>PIPER HISPIDINERVIUM</i>) <i>IN VITRO</i>	76
4.3 - ARTIGO III - ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA UMIDADE DE SEMENTES DE PIMENTA LONGA (<i>PIPER HISPIDINERVIUM</i>) ARMAZENADAS EM CONDIÇÕES DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO SOBRE A VIABILIDADE GERMINATIVA <i>IN VITRO</i>	93
CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	106
5.1 – OTIMIZAÇÃO DO USO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO PARA A FORMAÇÃO DE MASSA CELULAR.....	106
5.2 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SACAROSE SOBRE A FORMAÇÃO DE CÉLULA EM MEIO LÍQUIDO.....	120
5.3 - DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DE <i>P. hispidinervium</i>	125
5.4 - ENSAIOS EM BIORREACTORES.....	136
5.4.1 - ENSAIOS EM BIORREATOR DE BALÃO DE FUNDO CHATO.....	136
5.4.2 - ENSAIOS EM BIORREATOR DE COLUNA DE BOLHAS.....	137
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	141
6.1 - CONCLUSÃO.....	141
6.2 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	143
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144
ANEXO I – COMPOSIÇÃO DO MEIO MURASHIGE & SKOOG (1962).....	160
ANEXO II – DETERMINAÇÃO GRÁFICA DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.....	162

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 2.1 - Arbusto de Pimenta longa.....	5
Figura 2.2 - Ramo de pimenta longa com inflorescência.....	5
Figura 2.3 - Derivados do safrol (Pescador <i>et al.</i> , 2000).....	7

CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS

Figura 3.1 - Espiguetas maduras de pimenta longa <i>in natura</i>	45
Figura 3.2 – Esquema do equipamento utilizado para a realização dos ensaios de secagem e determinação de massa ao longo do tempo.....	46
Figura 3.3 - Placa de Petri contendo meio MS e sementes de pimenta longa, logo após a inoculação.....	48
Figura 3.4 – Placa de Petri contendo microplantas de pimenta longa, 60 dias após a inoculação.....	52
Figura 3.5 – Tubo de ensaio contendo dois explantes de folhas de microplantas de pimenta longa.....	52
Figura 3.6 – Vidro de conserva contendo explantes de folhas de microplantas de pimenta longa.....	53
Figura 3.7 – Medidores padronizados de aço inoxidável.....	54
Figura 3.8 – Esquema da instalação do reator de balão de fundo chato.....	57
Figura 3.9 – Aparelhagem em vidro contendo o biorreator, dois umidificadores e dois filtros de algodão.....	57
Figura 3.10 – Biorreator de balão de fundo chato de vidro e aeração central (B I).....	58
Figura 3.11 – Biorreator de coluna de bolhas tubular (BII).....	59
Figura 3.12 - Exemplo de uma curva de calibração de safrol com concentrações entre 0,01 e 0,07 % (p/v).....	62
Figura 3.13 - Exemplo de um cromatograma realizado com amostra com concentração de safrol (PA) de 0,01%.....	63

CAPÍTULO IV – ESTUDOS PRELIMINARES

Artigo I

Figura 1 – Esquema do equipamento utilizado para a realização dos ensaios de secagem e determinação de massa ao longo do tempo.....	71
Figura 2 – Efeito da temperatura (35, 42, 50, 60°C) sobre o teor de umidade de espiguetas de pimenta longa.....	73

Figura 3 – Variação da velocidade de secagem $-d(X/X_0)/dt$ em função do teor de umidade adimensional X/X_0	74
Artigo II	
Figura 1 – Espiquetas de pimenta longa maduras <i>in natura</i>	79
Figura 2 - Placa de Petri contendo meio MS e sementes de pimenta longa.....	81
Figura 3 - Percentagem de sementes geminadas após secagem em temperaturas de 35, 42, 50 e 60°C (sementes sem armazenamento).....	82
Figura 4 – Variação da taxa de germinação de sementes armazenadas em temperatura ambiente, geladeira e freezer nas diferentes condições de secagem: (a) sementes submetidas à secagem a 35°C, (b) sementes submetidas à secagem a 42°C, (c) sementes submetidas à secagem a 50°C e (d) sementes submetidas à secagem a 60°C.....	84
Artigo III	
Figura 1 – Espiquetas de pimenta longa maduras <i>in natura</i>	96
Figura 2 - Placa de Petri contendo meio MS e sementes de pimenta longa	98
Figura 3 - Perfil do percentual de sementes de pimenta longa geminadas com umidades de 10, 15, 20, 28, 38 e 45% armazenadas em geladeira, durante 44 semanas.....	100
Figura 4 - Perfil do percentual de sementes de pimenta longa geminadas com umidades de 10, 15, 20, 28, 38 e 45% armazenadas em freezer, durante 44 semanas.....	100
 CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÕES	
Figura 5.1 - Tubo de ensaio contendo calo friável de pimenta longa formado em meio MS37, após 30 dias de cultivo.....	119
Figura 5.2 – Calos de pimenta longa em fase inicial de degradação apresentando escurecimento das células.....	119
Figura 5.3 - Biomassa (massa seca) acumulada em 30 dias de cultivo em frascos agitados contendo meio MS37 e concentrações iniciais de sacarose de 5, 10, 20, 30, 50 e 60 g/L.....	121
Figura 5.4 - Concentração de carboidratos residuais determinados após 30 dias de cultivo iniciados com concentrações de 5, 10, 20, 30, 50 e 60 g/L de sacarose no meio.....	121
Figura 5.5 - Viabilidade celular relativa de células de <i>P. hispidinervium</i> determinada ao final do cultivo em frascos agitados com diferentes concentrações iniciais de sacarose, 5, 10, 20, 30, 50 e 60 g/L.....	123
Figura 5.6 - Perfil de crescimento, consumo de substrato e pH do meio de cultivo de células de <i>Piper hispidinervium</i> em meio MS37 em <i>shake</i> com iluminação de 2500 Lux e fotoperíodo de 16 horas luz/dia.....	126
Figura 5.7 - Perfil de crescimento, consumo de substrato e pH do meio de cultivo de células de <i>Piper hispidinervium</i> em meio MS37 em <i>shaker</i> no escuro.....	126

Figura 5.8 - Perfil de crescimento, consumo de substrato e pH do meio de cultivo de células de <i>Piper hispidinervium</i> em meio MS37 com quitosana <i>shaker</i> com iluminação de 2500 Lux e fotoperíodo de 16 horas luz/dia.....	127
Figura 5.9 - Perfil do consumo de sacarose, glicose e frutose durante o cultivo de células de <i>P. hispidinervium</i> em meio MS37 em <i>shaker</i> com iluminação de 2500 Lux e fotoperíodo de 16 horas luz/dia.....	132
Figura 5.10 - Perfil do consumo de sacarose, glicose e frutose durante o cultivo de células de <i>P. hispidinervium</i> em meio MS37 em <i>shaker</i> no escuro.....	133
Figura 5.11 - Perfil do consumo de sacarose, glicose e frutose durante o cultivo de células de <i>P. hispidinervium</i> em meio MS37 com quitosana em <i>shaker</i> com iluminação de 2500 Lux e fotoperíodo de 16 horas luz/dia.....	133
Figura 5.12 – Cromatograma do extrato das células de <i>Piper hispidinervium</i> cultivadas em meio sólido e em meio líquido.....	136
Figura 5.13 - Evolução do aumento da vazão de ar em cultivo de células de <i>Piper hispidinervium</i> em biorreator de coluna de bolhas com 500 mL de meio.	138

Anexo II

Figura All 1 – Determinação da velocidade específica máxima de crescimento de células de <i>P. hispidinervium</i> cultivadas em meio MS37 sob agitação de 100 rpm e iluminação de 2550 Lux e fotoperíodo de 16 horas de luz/dia.....	163
Figura All 2 – Determinação do fator de conversão de carboidratos totais em células de <i>P. hispidinervium</i> cultivadas em meio MS37 sob agitação de 100 rpm e iluminação de 2550 Lux e fotoperíodo de 16 horas de luz/dia.....	163
Figura All 3 – Determinação da velocidade específica máxima de crescimento de células de <i>P. hispidinervium</i> cultivadas em meio MS37 sob agitação de 100 rpm e no escuro.....	164
Figura All 4 – Determinação do fator de conversão de carboidratos totais em células de <i>P. hispidinervium</i> cultivadas em meio MS37 sob agitação de 100 rpm e no escuro.....	164
Figura All 5 – Determinação da velocidade específica máxima de crescimento de células de <i>P. hispidinervium</i> cultivadas em meio MS37 com adição de quitosana, sob agitação de 100 rpm e iluminação de 2550 Lux e fotoperíodo de 16 horas de luz/dia.....	165
Figura All 6 – Determinação do fator de conversão de carboidratos totais em células de <i>P. hispidinervium</i> cultivadas em meio MS37 com adição de quitosana, sob agitação de 100 rpm e iluminação de 2550 Lux e fotoperíodo de 16 horas de luz/dia.....	165

LISTA DE TABELAS

Capítulo II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2.1 – Variação dos preços de safrol no mercado externo.....	8
---	---

Tabela 2.2 - Características relevantes de cultivo de microrganismos e células de plantas.....	12
---	----

Capítulo III - MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 3.1 – Numeração dos diferentes meios de indução de calo e formação de massa celular.....	50
--	----

Capítulo IV – ESTUDOS PRELIMINARES

Artigo I

Tabela 1 – Relação dos valores de teor de umidade de equilíbrio e tempo para as temperaturas de secagem de 35, 42, 50 e 60°C.....	72
--	----

Tabela 2 – Relação entre tempo de secagem e percentagem de água de sementes de pimenta longa para as temperaturas de secagem de 35, 42, 50 e 60°C.....	73
---	----

Artigo II

Tabela 1 – Relação entre tempo de secagem e percentagem de água de sementes de pimenta longa para as temperaturas de secagem de 35, 42, 50 e 60°C.....	82
---	----

Tabela 2 – Valores médios de índices de germinação total* (%) de sementes de pimenta longa armazenadas em diferentes condições de temperatura.....	86
---	----

Tabela 3 – Valores percentuais médios de sementes germinadas 10, 15 e 20 dias após a inoculação nos diferentes tempos de armazenamento e tratamentos de secagem e condição de armazenamento	89
--	----

Tabela 4 – Percentagem de sementes germinadas após 320 dias de armazenamento em freezer e em geladeira.....	90
--	----

Artigo III

Tabela 1 – Influência do percentual de água contido nas sementes de pimenta longa conservadas em freezer e em geladeira.....	102
---	-----

Capítulo V - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tabela 5.1 – Aspectos da morfogênese *in vitro* e descrição das características adquiridas pelos explantes após os tratamentos realizados com reguladores de crescimento..... 107

Tabela 5.2 – Valores médios das massas determinadas nos tratamentos onde houve formação de calo..... 116

Tabela 5.3 - Efeito das diferentes concentrações iniciais de sacarose sobre a concentração máxima de célula em massa seca (X_{max}), o fator de conversão de carboidratos em célula ($Y_{X/S}$), a velocidade de consumo de sacarose (r_s) e o valor de pH do meio (final) em cultivos de *P. hispidinervium* em suspensão realizados em frascos agitados..... 124

Tabela 5.4 - Efeito das diferentes condições de cultivo sobre a concentração máxima de célula em massa seca (X_{max}), o fator de conversão de carboidratos em célula ($Y_{X/S}$), a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), a produtividade em célula (P_X) e o tempo de geração (T_g) em cultivos em suspensão de células de pimenta longa realizados em frascos agitados..... 129

ANEXO I

Tabela A1 – Composição mássica e molar do meio MS (Murashige & Skoog, 1962)..... 161

GLOSSÁRIO

Adventício: órgão vegetal formado em posição diferente daquela onde se origina no curso normal de desenvolvimento. Por exemplo, raiz desenvolvida em um segmento de caule.

Calo: massa de células de proliferação contínua e mais ou menos desordenada (Handro & Floh, 1990), parcialmente indiferenciada que variam quanto ao tipo, tamanho, conteúdo celular e espessura da parede (Flores, *et al.*, 1998).

Calogênese: formação de calo.

Cultura fotoautotrófica: cultura na qual não é necessária a adição de uma fonte de carbono exógena no meio. A fixação de CO₂ por fotossíntese fornece carboidratos suficientes para manutenção e multiplicação celular.

Desdiferenciação: processo no qual uma célula diferenciada perde suas características específicas, reassumindo atividades meristemáticas.

Diferenciação: especialização morfológica e bioquímica de uma célula. Mudanças fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e anatômicas que ocorrem em uma célula, tecido, órgão ou planta, durante o desenvolvimento do estado meristemático ou juvenil para o adulto.

Elicitor: componente que induz resposta de defesa na planta hospedeira podendo ser derivado de um microrganismo patogênico (elicitador biótico) ou um material inorgânico (elicitador abiótico).

Embriogênese: iniciação da formação de um embrião.

Explante: fragmento retirado do tecido da planta utilizado para iniciar uma cultura de tecido ou célula vegetal.

Fitoalexinas: são compostos químicos de baixo peso molecular considerados de defesa que são produzidos por tecidos de plantas em resposta a vários fatores de estresse (Gagnon & Ibrahim, 1997) e com atividade antimicrobiana produzida como resposta a uma infecção microbiana (Verpoorte, *et al.*, 1999).

Friabilidade: capacidade das células vegetais se separarem uma das outras quando cultivadas *in vitro*.

Friável: esmigalhável, fragmentável com facilidade, de fácil separação.

Indução: iniciação da formação de um órgão ou processo *in vitro*. Desencadeamento de um processo morfogenético pela exposição do explante a estímulos físicos, químicos ou biológicos. A indução envolve o controle da expressão gênica, sem alteração no

patrimônio genético de organismos, ou seja, este termo se refere somente à expressão de genes preexistentes.

Meristema: tecido composto de células não diferenciadas; envolvido na síntese protoplasmática e formação de novas células por divisão mitótica.

Metabólitos primários: são compostos envolvidos nas funções básicas da célula, como divisão e crescimento celular, respiração e reprodução.

Micropropagação: multiplicação de clones de plantas originados a partir de cultura *in vitro*.

Microplanta: planta obtida da germinação *in vitro*.

Morfogênese: processo consequente de divisão e diferenciação celular integrados, conduzindo o calo a um nível de organização supracelular.

Organogênese: processo de neoformação de parte aérea ou raiz a partir de calo ou de outros explantes.

Plântula: planta em miniatura com raízes e folhas regeneradas por cultura de tecidos.

Reguladores de crescimento vegetal: compostos sintéticos com ação igual ou semelhante aos hormônios naturais das plantas.

Totipotência: propriedade inerente às células vegetais de manifestar, em momentos diferentes e sob estímulos apropriados, a potencialidade em iniciar um novo indivíduo multicelular.

Variação epigênica: variação transitória em um fenótipo, sem alteração do genótipo, que é encontrada em plantas originadas de cultura de tecidos ou *in vitro*. Essa variação não é transmitida por reprodução sexuada.

Variação somaclonal: termo que descreve as variações espontâneas observadas entre os tecidos cultivados *in vitro* (Flores, *et al.*, 1998). É transmitida por reprodução sexuada.

NOMENCLATURA

ANA - ácido α naftaleno acético;

2,4-D - ácido 2,4 diclofenoxiacético;

BAP - 6-benzilaminopurina;

d - dia;

gms - grama de massa seca;

gmf - grama de massa fresca;

IC - índice de crescimento;

KIN - cinetina

MC_f - Massa celular final [g];

MC_i - Massa celular inicial [g];

MP - medida padrão;

P_s - velocidade de consumo de substrato [g/L.d];

P_x - produtividade em célula [g/L.d];

S_i - concentração inicial de substrato [g/L];

S_f - concentração final de substrato [g/L];

S_t - concentração de substrato no tempo t [g/L];

t - tempo [d];

X - concentração de célula [g/L];

X_{max} - concentração máxima de célula [g/L];

X_i - concentração inicial de célula [g/L];

X_t - concentração de célula no instante t [g/L];

Y_{x/S} - fator de conversão de substrato em célula [g de substrato/ g de célula];

μ_x - velocidade de crescimento celular [d⁻¹];

μ_{max} - velocidade específica de crescimento máxima [d⁻¹];

RESUMO

A pimenta longa (*Piper hispidinervium*) é uma planta de origem amazônica que tem despertado interesse por conter em seu óleo essencial alto teor de safrol, composto aromático de grande importância para a indústria química e farmacêutica. A utilização de técnicas biotecnológicas para a produção de células e/ou metabólitos vegetais se encontram em crescente desenvolvimento nos diversos ramos da ciência. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar a formação de massa celular de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) em meio sólido e em meio líquido no âmbito da Engenharia Química.

Para a formação de massa celular (calo) em meio sólido foram realizados experimentos onde variaram-se as concentrações de auxina (ácido 2,4 diclofenoxiacético e ácido naftaleno acético) e citocinina (cinetina e 6-benzilaminopurina). Dos 42 tratamentos realizados, em 10 foi verificada a formação de massa celular, sendo os meios MS37 (5,0 mg/L de 2,4D e 10,2 mg/L de BAP) e MS 40 (5,0 mg/L de ANA e 10,2 mg/L de BAP) os que apresentaram maior formação de calo, com 10,49 e 9,61 gm^f de célula e índices de crescimento de 73,69 e 54,61 gm^f de células formadas/ g de explante, respectivamente. Assim, conclui-se que para a formação de calo da pimenta longa é necessário o uso de elevadas concentrações de reguladores de crescimento, com um balanço hormonal pró-citocinina.

Em meio líquido foram realizados ensaios em frascos agitados e em biorreatores aerado, tipo coluna de bolhas. Em experimentos realizados durante 30 dias em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio MS37, agitação de 100 rpm e intensidade luminosa de 2500 Lux, foram testadas diferentes concentrações iniciais de sacarose. Para concentrações iniciais de sacarose de 5, 10, 20, 30, 50 e 60 g/L as concentrações de células máximas obtidas foram 2,1; 3,2; 7,6; 10,7; 4,6; 1,5 gms/L, respectivamente, destacando-se o meio com 30 g/L como a condição que demonstrou melhor formação de massa. Esta configuração de meio foi utilizada para a determinação das curvas de crescimento e de consumo de carboidratos.

Três condições foram impostas para a realização dos cultivos para estabelecimento do crescimento celular: meio MS37 sob intensidade luminosa de 2500 Lux, sem e com quitosana (1,8 mg/gm^f de célula), e meio MS37 no escuro. As células de pimenta longa, nestas condições apresentaram uma fase lag prolongada e

seguiram uma cinética exponencial de crescimento. Os ensaios realizados sem elicitor, no claro e no escuro, não apresentaram diferença nas velocidades máximas de crescimento na fase exponencial, sendo $0,078\text{ d}^{-1}$; $0,077\text{ d}^{-1}$, respectivamente, enquanto que no ensaio com quitosana o valor foi de $0,054\text{ d}^{-1}$. Entretanto, o ensaio realizado sob luz se mostrou mais produtivo, superando em 14% o ensaio no escuro e 56% o ensaio com quitosana.

Apesar da presença de quitosana interferir negativamente no crescimento celular, por ser um fator de estresse à célula, se apresentou como um composto elicitor da formação de safrol, tendo sido detectado $25\text{ }\mu\text{g/gms}$ de célula.

Utilizando-se meio MS37 em biorreator de coluna de bolhas com vazão de ar de $0,3\text{ vvm}$, obteve-se uma produtividade em célula (P_x) de $0,416\text{ g/dia}$, produtividade esta 19 % maior que a obtida em frasco agitado. Este resultado demonstra que maiores estudos devem ser conduzidos com intuito de estabelecer a produção de safrol *in vitro*, sendo a Engenharia Química, mais especificamente a Engenharia Bioquímica, indispensável para a condução de estudos em biorreatores e estabelecimento de condições de processos que permitam a utilização de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) como fonte de metabólito de interesse comercial.

ABSTRACT

Piper hispidinervium is a plant of amazonic origin, which has been attracting great attention because of its essential oil with high level of safrole, an aromatic compound of great importance for chemical and pharmaceutical industry. The use of biotechnological techniques aiming the production of vegetal cells and/or metabolites is in great development in the most diverse branches of science. Within this context, the present work had as its objective to study the formation of cellular mass of *P. hispidinervium* in liquid and solid medium in the scope of Chemical Engineering.

Aiming the formation of cellular mass (callus) in solid medium, several experiments were performed with different concentrations of auxine (2,4 diclofenoxiacetic acid and naphtalenacetic acid) and cytokinine (cinetine and 6-benzylaminopurine). From a total of 42 treatments performed, the formation of cellular mass was verified in 10, being the mediums MS37 (5,0 mg/L of 2,4D and 10,2 mg/L of BAP) and MS40 (5,0 mg/L of ANA and 10,2 mg/L of BAP) the ones where the greater formation of callus was observed with 10,49 e 9,61 gfw of cell and growing indices of 73,69 and 54,61 gfw of formed cells/ g of explant, respectively. Than, it is possible to conclude that for the formation of callus of *P. hispidinervium* it is necessary to use high concentrations of growing regulators, with a hormonal balance pro-cytokinine.

Essays in stirred flasks and aired bioreactors, like bubble columns were performed in liquid medium. In experiments performed during 30 days in flasks of 250 mL containing 100 mL of MS37 medium, under stirring of 100 rpm and luminous intensity of 2500 Lux, different concentrations of sucrose were tested. For initial concentrations of sucrose of 5, 10, 20, 30, 50 and 60 g/L the maximum concentrations of cells that were obtained were 2,1; 3,2; 7,6; 10,7; 4,6; 1,5 gdw/L, respectively.

As the initial concentration of sucrose of 30 g/L in MS37 medium was the condition that led to better mass formation, the former configuration of the medium was used for the determination of growth curves and carbohydrates consumption curves. Three conditions were imposed in order to perform the cultivates: MS37 medium under luminous intensity of 2500 Lux, with and without chitosan (1,8 mg/gfw of cell), and MS37 medium in darkness. The long pepper's cells, under the former conditions, presented a long lag phase and followed an exponential kinetics of growth. The essays that were performed without elicitor, in brightness or darkness, did not present

differences in the maximum growth velocities during the exponential phase, being them of 0,078 d⁻¹; 0,077 d⁻¹, respectively, while in the essay with chitosan the value was of 0,054 d⁻¹. However, the essay that was performed in brightness proved to be more productive, surpassing in 14% the essay that was performed in darkness and in 56% the essay with chitosan.

Nevertheless, although the presence of chitosan seems to interfere in a negative way in the cellular growth, as it is a stressing factor for the cell, these compound showed as elicitor to safrole formation, had been detected 25 µg/gdw cell.

The experiments that were performed in bioreactors with MS37 medium and 0,3 vvm presented the cell productively (Px) of 0,416 gdw/d, being this value 19% higher than the Px obtained in flask. This result shows that others studs has to be conduct with purpose of establish the in vitro safrole production. In this context, the Chemical Engineering is indispensable to the conduction for the bioreactors experiments and to the process condition establishment that allows the *Piper hispidinervium* use as source of metabolite with commercial interest.

Capítulo I

Introdução

Metabólitos secundários de plantas são moléculas conhecidas pelo essencial papel na adaptação das plantas ao seu ambiente e, também, representam uma importante fonte de compostos ativos farmacêuticos, pigmentos, fragrâncias, aditivos alimentícios, etc. Contudo, a produção de compostos fitoquímicos freqüentemente envolve a extração da planta viva, a qual necessita, muitas vezes, muito tempo para se desenvolver, e pode levar à extinção de espécies nativas.

A exploração de óleos essenciais de plantas começou historicamente no Oriente vários anos antes de Cristo, mas somente com o advento da química fina é que a atividade tomou impulso, permitindo a manipulação destes metabólitos com várias aplicações científicas.

O safrol, principal componente do óleo de sassafrás, é largamente utilizado por vários segmentos da indústria e tem alcançado altas cotações no mercado. Trata-se de um componente químico aromático que ocorre naturalmente, sendo empregado pela indústria química como matéria-prima na manufatura de heliotropina – um importante fixador das fragrâncias – e de butóxido de piperonila (PBO) – usado como agente sinérgico nos inseticidas naturais, como o piretrum.

O Brasil já foi o maior produtor mundial de safrol, tendo no Vale do Itajaí (SC) a maior Região produtora através da extração de canela sassafrás (*Ocotea odorifera*). Com a proibição do corte de canela sassafrás em 1991, pelo IBAMA, em função do risco de extinção da planta, o Brasil passou de exportador, a importador do produto.

Com a identificação pelo INPA (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia) da espécie *Piper hispidinervium* (pimenta longa), uma piperácea com elevados teores de safrol em seu óleo essencial (em torno de 90%), houve surgimento de uma fonte alternativa natural deste componente.

O ciclo de vida médio apresentado pela pimenta longa favorece o estudo de cultivo *in vitro* desta planta com vistas à produção do safrol. Os processos

biotecnológicos, utilizando técnicas *in vitro* rigorosamente controladas para o cultivo de células, tecidos e órgãos vegetais ou de plantas íntegras para a produção de compostos de interesse à sociedade, têm sido considerados como sistemas de alto potencial para a superação de muitos problemas encontrados na produção a campo da planta, como sazonalidade, variação ambiental, localização geográfica, ataque de pragas e instabilidade política.

Metodologias de cultura de células vegetais apresentam o potencial de superar os problemas ora citados e, ainda, permitem a realização de estudos de síntese de metabólitos secundários e de rendimento de produção destes compostos comparativamente ao sistema *ex vitro*, com a possibilidade de produção controlada de acordo com a demanda.

Neste sentido, este trabalho tem como objetivo estudar a formação de massa celular em meio sólido e em meio líquido de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) frente a diferentes condições de cultivo. Este É um trabalho pioneiro, em nível nacional, sobre cultivo de células vegetais no âmbito da Engenharia Química com ênfase em bioprocessos.

Em meio sólido, foram realizados experimentos de otimização de meio de cultura em termos de reguladores de crescimento para a formação de massa celular (calos), onde foram estabelecidas concentrações e os tipos de auxinas e citocininas para a formação de calos de explantes de folhas de pimenta longa.

Tendo em vista a falta de dados a respeito do cultivo *in vitro* de células de pimenta longa, este trabalho procurou estabelecer as condições adequadas de cultivo em diferentes concentrações iniciais de sacarose e, posteriormente, foram determinadas as curvas de crescimento e de consumo de substrato em meio MS com e sem quitosana e em ausência de luz.

A fim de obter material vegetal para a realização de estudos com células foi necessário realizar estudos de conservação de sementes para prolongar a sua viabilidade germinativa. Esses estudos, denominados de estudos preliminares, foram realizados para determinar as melhores condições de temperatura de secagem, de temperatura de armazenamento e de umidade da semente, de forma a garantir a realização e manutenção dos experimentos durante a época de entressafra.

Neste trabalho há uma revisão bibliográfica pertinente ao assunto, onde são apresentados tópicos contendo descrições sobre a pimenta longa e seu metabólito de interesse, o safrol e sua utilização. Na seqüência, têm-se mencionado referências

sobre o cultivo de células vegetais na produção de metabólitos secundários, descrevendo o “estado da arte” do tema com todas as vantagens e dificuldades pertinentes à biotecnologia vegetal.

Toda a metodologia proposta para execução deste trabalho está apresentada no capítulo de Material e Métodos. Neste capítulo se encontram, de forma detalhada, as propostas de conservação de sementes de pimenta longa, formulações de meio de cultivo para produção de calo, técnicas de manipulação do material vegetal, bem como as técnicas analíticas utilizadas para determinação de concentração de células, safrol e carboidratos solúveis totais, açúcares redutores totais e glicose.

Os resultados experimentais obtidos estão demonstrados no capítulo de Resultados e Discussão, e são comparados com dados de cultivos celulares de outras plantas encontrados na literatura.

Por fim, são apresentadas as conclusões obtidas com as atividades desenvolvidas neste trabalho, bem como sugestões para trabalhos posteriores.

Capítulo II

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo estão apresentados tópicos sobre pimenta longa e safrol, cultura de células vegetais, estratégias utilizadas para elevar o poder de produção de metabólitos secundários em cultura de células vegetais e as variáveis físicas e químicas que influenciam essa produção e um tópico sobre biorreatores. Os itens aqui contemplados estão relacionados ao tema da tese e servirão de base para explicar os fenômenos observados durante a execução dos experimentos realizados com células de pimenta longa.

2.1. REINO VEGETAL

As plantas são uma valiosa fonte de uma gama de produtos do metabolismo primário e secundário, os quais são utilizados como fármacos (com ação tranqüilizante, analgésica, antiinflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, etc.), agroquímicos, flavorizantes, aromatizantes, corantes, bioinseticidas, aditivos alimentares e outros. Segundo Ramachandra Rao & Ravishankar (2002), o número de estruturas químicas encontradas no reino vegetal é estimado ser quatro vezes maior que no reino dos microrganismos, sendo que as plantas continuarão proporcionando novos produtos e novas estruturas químicas para novas drogas nos próximos séculos, devido a química da maioria das espécies de plantas não ter sido ainda caracterizada. Atualmente, a metade dos medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em produtos naturais de plantas (Pletsch, 2000).

2.1.1. PIMENTA LONGA E SAFROL

A pimenta longa (*Piper hispidinervium*) é um arbusto ramificado, nodoso, podendo alcançar mais de 7 metros de altura; com inflorescência em forma de pedúnculos, folhas glabras ou pouco pubescentes, podendo apresentar pontuações glandulares (Rocha & Ming, 2001). É uma planta rústica, muito exigente em água e luz e aparece com frequência em áreas de capoeira (EMBRAPA/Acre, 2001). Nas Figuras 2.1 e 2.2 estão apresentadas fotos da planta de pimenta longa e, em detalhe, um ramo com folhas e inflorescência.

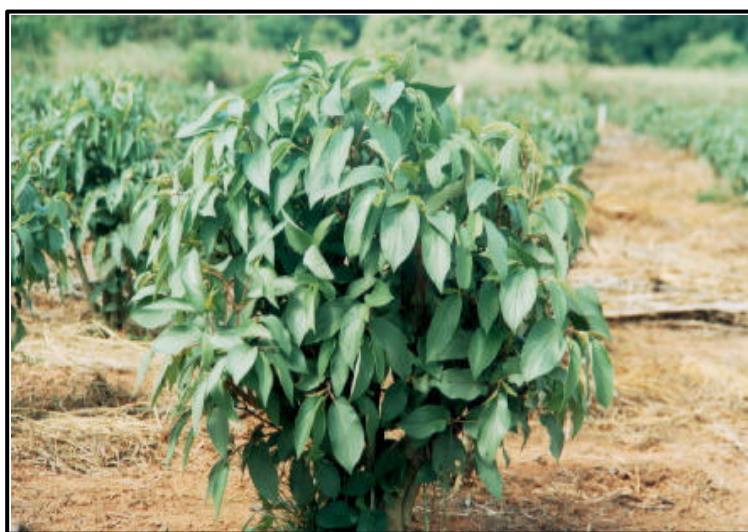


Figura 2.1 - Arbusto de pimenta longa.

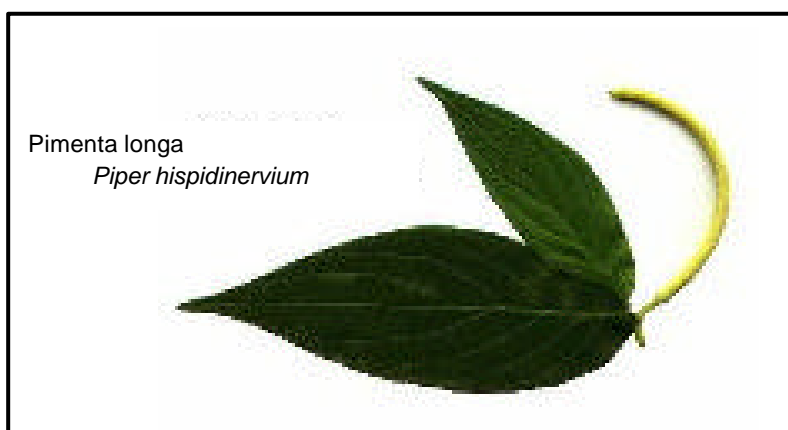


Figura 2.2 - Ramo de pimenta longa com inflorescência.

A *Piper hispidinervium* está distribuída na América do Sul, especialmente no Estado do Acre - Brasil, acreditando-se se estender por toda Amazônia, bem como Peru e Bolívia (Rocha & Ming, 2000 e Oliveira, 1998).

Esta Piperácea representa uma das maiores promessas brasileiras para a fitoquímica mundial, devido à possibilidade de substituição do óleo de sassafrás, extraído das espécies em extinção *Ocotea odorifera* Ness (Mez), *Cynamomum petrophilum*, *C. mollissimum* e *Sassafrás albidum* Nutt. Seu óleo essencial, contido principalmente nas folhas e talos finos, apresenta um alto teor de safrol (cerca de 85 a 95%), o qual é um importante substrato para a indústria química e farmacêutica.

O safrol, ou 4 – alil – 1,2 – metilenodioxibenzeno, é um éter fenólico do grupo dos anilpropanóides, com fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_2$, ponto de ebulição de 232 °C – 235°C e que se solidifica a uma temperatura de 11°C. É um líquido levemente amarelo de odor característico, insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos, tais como etanol, clorofórmio e éter etílico (Pescador *et al.*, 2000). É um composto natural de distribuição ampla no reino vegetal, no entanto, se encontra armazenado em quantidades apreciáveis em espécies das famílias *Aristolochiceae*, *Lauraceae* e *Piperaceae* (Costa, 2000).

É um componente que, embora apresente atividades carcinogênicas *in vitro*, é de grande importância científico-tecnológica como precursor de uma variedade de compostos, notadamente, fármacos, inseticidas biodegradáveis (piretróides naturais), fixadores de perfume (heliotropina) e, mais recentemente, de drogas antitrombóticas e auxinas endólicas (Rosa *et al.*, 2000). Costa (2000) afirma que a utilização do safrol como matéria-prima na preparação de fármacos de natureza catecólica, como a dopamina, a α -metildopa, o isoproterenol, entre outros, é o principal fator responsável pelo grande volume de transações comerciais envolvendo o óleo de sassafráz. Na Figura 2.3 estão representados alguns dos mais importantes derivados do safrol.

O óleo de sassafrás, devido a seu aroma característico, já foi usado como aromatizante de alimento, porém o seu uso para este fim está proibido devido sua toxicidade, com efeitos hepatotóxicos e cancerígenos (Costa, 2000).

Até a década de 60, o Brasil era o maior exportador mundial de óleo de sassafrás, sendo que esta produção entrou em declínio em função do esgotamento das reservas naturais das quais este era obtido, tronco de *O. odorifera* (Canela sassafrás), selvagens em áreas de Mata Atlântica no Sul do Brasil, principalmente no

Estado de Santa Catarina, no Vale do Itajaí (Jornal do Comércio, 1999; Rocha & Ming, 2001).

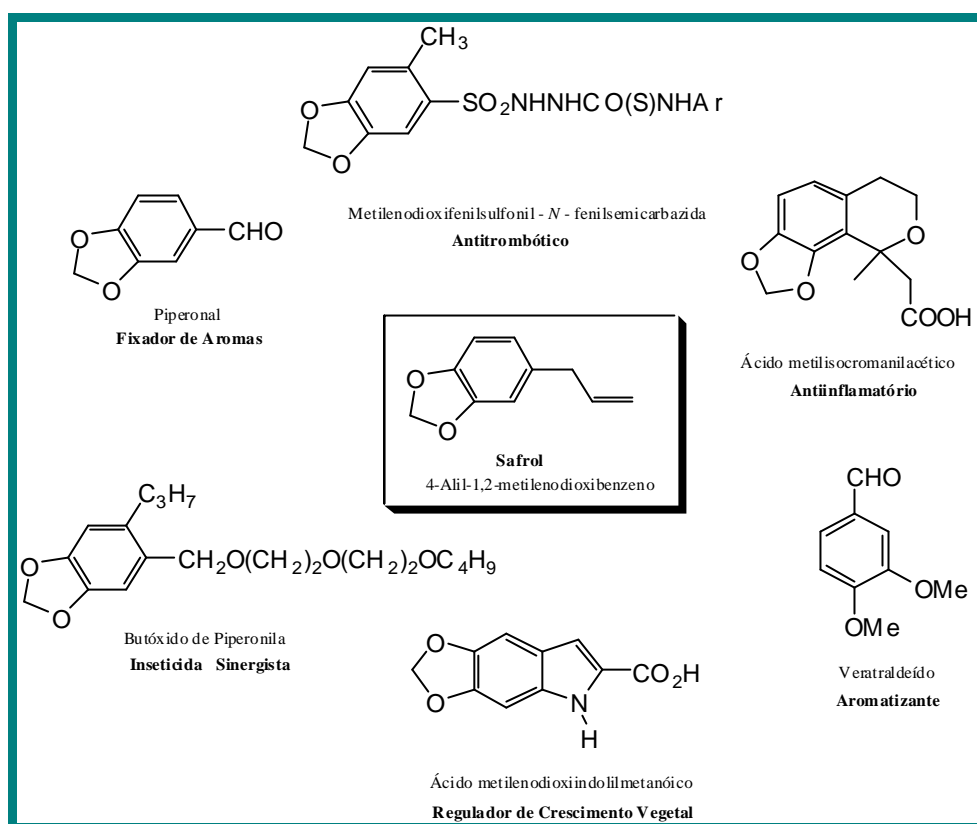


Figura 2.3 - Derivados do safrol (Pescador *et al.*, 2000)

A proibição por parte do IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, através do Decreto nº 1557/91, motivado pelo iminente perigo de extinção desta espécie da família das Lauráceas, proveniente das florestas exploradas por processo extrativista; forçou o Brasil a importar o óleo essencial contendo safrol da China e do Vietnã (Pinho de Sá *et al.*, 1998; Pimentel, Rocha & Cabral, 1999, EMBRAPA/Acre, 2001). Entretanto, a produção destes países não atende à demanda internacional, a qual gira em torno de 3000 toneladas/ano a um preço variável do litro do produto entre U\$ 4,50 e U\$ 14,00 (A Tarde, 1999, Oltramari, 2002). Na China, obtém-se o safrol pelo corte de árvores nativas (*Cinnamomum canphora* – madeira canforeira), enquanto que no Vietnã utilizam-se de troncos e raízes de árvores mortas, sendo que em ambos, existe o risco de extinção das espécies (Costa, 2000; Pinho de Sá *et al.*, 1998). Dados levantados por Oltramari *et al.* (2001) demonstraram a ocorrência de variação significativa no preço do óleo de

sassafrás no mercado externo, o qual apresenta tendência de alta, uma provável consequência da escassez do produto decorrente do sistema extrativista de produção, também utilizada nos principais países produtores. O mesmo autor divulgou em 2002 dados da variação de preços (US\$/kg) de safrol no mercado externo no período de 1993 a 1998, dados apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Variação dos preços de safrol no mercado externo (Oltamari, 2002).

Ano	Preço médio (US\$/kg)
1993	4,77
1994	2,82
1995	2,49
1996	6,00
1997	23,13
1998	14,00

A identificação da espécie *Piper hispidinervium* foi obtida na década de 70, por pesquisadores do INPA – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - ligado ao Ministério da Ciência e Tecnologia, através de um programa de Triagem de Plantas Aromáticas da Amazônia (Jornal do Comércio, 1999; EMBRAPA/Acre, 2001).

Existem outras duas espécies, a *Piper aduncum* e a *Piper hispidum*, de ocorrência em outros estados brasileiros, que apresentam safrol em seus óleos essenciais, no entanto, a concentração encontrada nestas plantas é pequena, o que inviabiliza a produção comercial do produto (EMBRAPA/Acre, 2001). Neste contexto, a pimenta longa é uma fonte alternativa de safrol natural a ser explorada.

A busca pela produção de safrol conduzindo pesquisadores a realizarem estudos alternativos para a obtenção deste metabólito, utilizando diferentes espécies, como, *Sassafrás officinale*, *Cinnamomum ssp*, *Magnólia kobus*, *Boronia safrolifrea*, *Laurelia serrata*, *Daphnandra aromática* e *Piper hispidinervium* (Silva 1987, citado por Oltamari, 2002; Pescador *et al.*, 2000)

2.2. CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS COMO FONTE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Constabel (1985) define cultura de células vegetais como uma variedade de técnicas com as quais se permite o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de protoplastos, células, tecidos e órgãos oriundos de sementes, plantas ou embriões em um ambiente definido. Street (1997), citado por Dodds e Roberts (1995), define o termo cultura de tecidos como o termo que se aplica a qualquer cultura multicelular crescendo sobre um meio sólido, ou imerso em meio líquido, que consiste de muitas células em crescimento contínuo. Tipicamente, a cultura de um explante consiste de um ou mais tecidos e resulta em um calo que não possui equivalência estrutural ou funcional com qualquer tecido de uma planta normal.

Células vegetais são totipotentes, o que significa que cada célula preserva informações genéticas completas e, conseqüentemente, é apta a produzir todos os compostos químicos produzidos pela planta-mãe.

A cultura de células e tecidos de plantas é fundamental para muitos aspectos da biotecnologia de plantas. Um grande número de aplicações das funções vegetais depende da habilidade de células e de tecidos vegetais crescerem em soluções nutrientes de composição conhecida. Dentre as aplicações, cita-se a propagação de plantas, a manutenção e estocagem de germoplasma, a produção de compostos químicos (fitoquímicos) de valor comercial, e a engenharia genética de plantas.

A origem de métodos de cultura de células vegetais data do final do século IXX, quando Gottlieb Haberlandt isolou células de plantas superiores e as manteve em estado viável numa solução de nutrientes (Fowler, 1988). Contudo, o início da obtenção da divisão celular só foi possível com o isolamento e identificação de uma molécula de alto poder regulatório, o ácido indol-3-acético (auxina), por Thimann em 1935 (Teixeira & Marbach, 2000) e, com a descoberta do hormônio citocinina, pelo grupo do Folke Skoog em meados dos anos 50. Os hormônios auxina e citocinina mostram uma ação sinérgica no crescimento e divisão celular (Torres *et al.*, 1998).

Dodds e Roberts (1995) descrevem que Muir, em 1953, propôs a transferência de fragmentos de calos para um meio de cultivo líquido, aerado e sob agitação, originando uma suspensão de células e agregados celulares. Em 1956, culturas de células de cenoura em suspensão tornam evidente que esta técnica oferece muitas oportunidades para o estudo da biologia e bioquímica das células. Neste contexto, a

suspensão celular destina-se à obtenção e proliferação de células em meio líquido, sob condição de agitação contínua, para evitar possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura (Barrueto Cid, 1998).

A motivação para o desenvolvimento de tecnologias na área de cultura de células vegetais vem da possibilidade de utilização da grande capacidade sintética de compostos químicos, por parte do reino vegetal, utilizado em benefícios social e/ou comercial, na forma de princípios ativos de fármacos, como aditivos alimentares, como componentes de cosméticos, perfumes, inseticidas, etc. Aliado a isto, tem-se o elevado custo e a complexidade da síntese química de muitas estruturas químicas naturalmente produzidas pelas plantas. A grande variedade de produtos do metabolismo das plantas inclui, por exemplo, terpenóides, esteróides, alcalóides, óleos essenciais, pigmentos e outros.

O desenvolvimento da área de cultura de células e tecidos vegetais é favorecido pela possibilidade da sua utilização para a elucidação de rotas metabólicas para síntese, acumulação e degradação de produtos; pela potencialidade de ampliação de escala (Stafford, 1991), e pelo fato de que a produção de metabólitos *in vitro* não é afetada por variações ambientais (cheias, secas, etc.), localização geográfica, ataque de pragas e instabilidade política (DiCosmos & Misawa, 1995; Misawa, 1994, Kieran *et al.*, 1997). Em plantas naturalmente cultivadas, os produtos desejados são geralmente sintetizados somente por curtos períodos de tempo e somente em poucos tipos de tecidos (Drapeau *et al.*, 1986), além de muitas plantas exigirem longos períodos de tempo entre a plantação e a colheita e grandes áreas de cultivo, o que eleva o custo de produção de determinadas drogas.

Uma gama de processos de cultura de tecidos têm sido desenvolvidos, mas a produção de metabólitos secundários em grandes biorreatores tem se tornado um método alternativo atrativo para a produção de compostos de alto valor agregado, com a possibilidade de controle da produção de acordo com a demanda, independentemente da sazonalidade, e a redução do período de produção do metabólito desejado, com aumento da qualidade do produto (Akalezi *et al.*, 1999; DiCosmos & Misawa, 1995; Fowler, 1988) e podendo obter rendimentos superiores aos observados na planta (Kieran *et al.*, 1997).

Como definição tem-se que, metabólitos secundários são compostos com restrita ocorrência em determinados grupos taxonômicos, que não são necessários para a vida da célula (organismo), mas desempenham um papel na interação da

célula (organismo) com seu meio ambiente decorrente da sobrevivência do organismo em seu ecossistema (Verpoorte, 2000). A divisão entre os produtos dos metabolismos primário e secundário é indistinta, devido a muitos dos compostos intermediários do metabolismo primário serem também intermediários do metabolismo secundário (Yeoman & Yeoman, 1996). Em muitas culturas de células vegetais, a produção de metabólitos secundários é, muitas vezes, obtida por supressão do crescimento celular, o que resulta na indução de enzimas relacionadas à sua biossíntese ou na acumulação de precursores (Kurata *et al.*, 1997).

Um outro problema enfrentado no uso de biotecnologia para produção de compostos do metabolismo secundário de plantas é o não conhecimento de rotas biossintéticas e dos mecanismos de regulação do acúmulo de metabólitos (Zhong *et al.*, 1995; Dörnenburg & Knorr, 1995).

Durante muitos anos, a biotecnologia de vegetais, principalmente a área específica de cultura de células vegetais, era vista como um exercício acadêmico ou intelectual, com o qual se obtinham informações sobre a fisiologia e a bioquímica das plantas (Fowler, 1988), mesmo sendo de grande importância para o estudo de rotas biossintéticas. Atualmente, é sabido que existem duas plantas industriais operando no Japão para síntese de produtos naturais (chiconina e berberina) utilizando cultura de células vegetais em meio submerso, em reatores de tanques agitados do tipo CSTR (Fowler, 1988; Ciência Hoje, 1995). Existe também a produção comercial, pela empresa Nitto Denko Co., Japão, de biomassa de células de ginseng (*Panax ginseng*) em biorreatores de tanque agitado de 20 m³ com produção de 500 – 700 mg/L/dia (DiCosmos & Misawa, 1995, Wu & Zhong, 1999). Outras empresas, como Ajinomoto e Nippon Shin-Yaku, vêm concentrando esforços para aumentar os níveis de acumulação de alcalóides, esteróides e outros produtos secundários em culturas de células (Misawa, 1994) e muitos processos têm sido patenteados, mas poucos têm provado ser economicamente viáveis (Kieran *et al.*, 1997).

O aumento do uso de sistemas de cultivo de células de plantas nos últimos anos é, talvez, devido a um aumento no entendimento da bioquímica das rotas metabólicas de plantas de grande importância econômica (DiCosmos & Misawa, 1995). Segundo Kieran *et al.* (1997), de uma perspectiva da engenharia, cultura de células em suspensão apresenta um potencial mais imediatista para aplicação industrial do que culturas de tecidos ou órgãos, devido ao extensivo corpo de

especialistas, o qual tem acumulado conhecimentos para o tratamento de culturas microbianas submersas.

Apesar da teoria propor o sucesso do uso de biorreatores de forma análoga às culturas microbianas, existem significantes diferenças que devem ser consideradas, as quais estão demonstradas na Tabela 2.2. Contudo, todas as culturas de microrganismos são literalmente culturas de organismos, enquanto que culturas de células vegetais, não. As plantas são organismos multicelulares, com estruturas altamente diferenciadas nas quais há divisão de funções entre as células (Yeoman & Yeoman, 1996).

Tabela 2.2 - Características relevantes de cultivo de microrganismos e células de plantas.

Características	Microrganismo	Células de plantas
Dimensões	1-2 x 2-7 μm (bactéria) Diâmetro 3,5 μm (levedura)	20 x 40 x 20-200 μm
Fragilidade à agitação	Insensível	Sensível
Conteúdo de água	75%	> 90%
Tempo de duplicação	Escala de horas	Escala de dias
Consumo de oxigênio	5-90 $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	1-4 $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
Aeração	1 – 2 vvm	0,3 vvm
Tempo de cultivo	Dias	Semanas
Acumulação de produtos	No meio de cultivo	No vacúolo
Fase de produção	Independente	Muitas vezes na fase estacionária ou pode estar ligado ao crescimento
Estabilidade	Normalmente estável	Instável
Células individuais	Quase sempre	Normalmente em agregados com 2-4 mm de diâmetro
Reprodução	Pode ser por esporos, pseudomecélis, etc.	Organogênese, embriogênese

Fonte: Misawa, 1994, Fowler, 1988.

Células vegetais crescem lentamente (tempo de duplicação de 2 a 3 dias) e conseqüentemente apresentam um baixo requerimento de oxigênio, comparativamente aos cultivos microbiológicos. É sabido que a sensibilidade das

células à agitação se deve ao seu grande tamanho, à rigidez da parede celular e ao grande vacúolo que possuem (Chang & Sim, 1995, Fowler, 1988, Fischer & Alfermann, 1995). A ausência de separação das células após a divisão celular leva à formação de agregados com dimensões de alguns milímetros e aumenta a susceptibilidade das células às forças mecânicas (Wilson & Hilton, 1995).

Além das diferenças citadas na Tabela 2.2, existem outros problemas associados à cultura de células vegetais: a baixa síntese dos produtos e capacidade de acumulação de produtos por parte das células (Stafford, 1991; Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002), a instabilidade das linhagens celulares produtoras (Misawa, 1994; Ertola *et al.*, 1995; Sajc *et al.*, 2000, Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002) e o elevado risco de contaminação microbiana (Ertola *et al.*, 1995). Existem casos em que os metabólitos secundários excretados devem ser removidos rapidamente (Ertola *et al.*, 1995).

Deve-se citar também o fato de que em células vegetais o vacúolo é usualmente o local de acúmulo de produtos, sendo a excreção de compostos para o meio de cultivo, rara, o que gera problemas para os processos de *downstream* (DiCosmos & Misawa, 1995).

As culturas de células de plantas, na sua maioria, produzem quantidades reduzidas e diferentes perfis de metabólitos secundários, quando comparadas à planta intacta, e essa quantidade e qualidade de produção pode mudar com o tempo (Sajc *et al.*, 2000). Essa característica pode ser atribuída à baixa diferenciação celular nas culturas (DiCosmos & Misawa, 1995), mas essa correlação não é universal (Yeoman & Yeoman, 1996).

A relação entre o grau de organização e a biossíntese de compostos é ainda obscura. A compartimentalização das enzimas e substratos, e locais reservados para a acumulação de produtos, podem ser alguns dos fatores envolvidos na biossíntese de compostos do metabolismo secundário de tecidos organizados (Dodds & Roberts, 1995).

Um fator limitante ao uso de cultivo *in vitro* de plantas citado por Zhang *et al.* (1998) está relacionado ao conhecimento insuficiente sobre os efeitos do ambiente físico-químico sobre o comportamento das células de plantas e a carência de um entendimento detalhado e o controle do estado fisiológico da população de célula.

Apesar dos entraves acima citados, diversas técnicas (item 2.2.2) vêm sendo utilizadas para que se obtenha um incremento na produção de metabólitos

secundários de células de plantas cultivadas em suspensão. Inclusive Dicosmo & Misawa (1995) e Oltramari (2002) citam algumas culturas que produzem quantidades superiores de metabólitos *in vitro* comparadas com a planta intacta.

2.2.1. FATORES DO AMBIENTE QUE INFLUENCIAM A CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS

O problema básico de cultura de células vegetais foi claramente descrito em 1954: “se todas as células de um dado organismo são essencialmente idênticas e totipotentes, então as diferenças celulares observadas em um organismo devem aparecer como resposta ao microambiente e a relação com as demais células do organismo” (Dodds & Roberts, 1995).

Assim, para realizar culturas *in vitro* de plantas, quer sejam de células isoladas, órgãos ou calos, deve-se, primeiramente, estabelecer as melhores condições da cultura, sendo fatores relevantes: o meio de cultura, a temperatura, a agitação, a aeração, o projeto do reator, os fatores de contaminação, a incidência de luz e fotoperíodo, a densidade celular, o uso de meio condicionado, o potencial osmótico e o pH.

2.2.1.1. MEIO DE CULTURA

O meio de cultura pode ser sólido (com partículas sólidas), semi-sólido (géis) ou líquido dependendo do tipo de cultivo desejado. Este pode ser de dois tipos: meio para crescimento e produção de biomassa e meio para produção e acumulação de metabólitos secundários (Ertola *et al.*, 1995)

A consistência do meio merece atenção com relação às concentrações dos componentes, principalmente dos reguladores de crescimento. A difusão dos componentes é alterada de acordo com a consistência do meio e, conseqüentemente, a disponibilidade dos elementos à célula vegetal também o é.

A composição do meio de cultura, em termos de macro e micro elementos e dos elementos orgânicos, também apresenta importância e, sendo assim, ao iniciar um processo biotecnológico com células vegetais, deve-se, em primeira instância, estabelecer a formulação adequada do meio que será utilizado. As plantas cultivadas *in vitro* são susceptíveis à composição do meio em que vivem. Através de mudanças apropriadas na composição do meio e nas condições de cultivo pode ser possível

estimular virtualmente todas as células numa cultura para torná-las biossinteticamente ativas por um período prolongado de tempo (Drapeau *et al.*, 1986).

Uma variedade de formulações estabelecidas de meio já estão catalogadas como sendo *standard* (meio basal padrão). O meio mais comumente utilizado para cultura de tecidos vegetais é o desenvolvido por Murashige & Skoog (1962) - meio MS – o qual apresenta como principal característica a sua elevada concentração de nitrato, potássio e amônia (Misawa, 1994). Outros meios *standards* podem ser citados: White, Gamborg (B5), Nitsch, Schenk – Hildebrandt, Nitsch-Nitsch, etc.

Os meios para células de plantas são meios complexos que apresentam em sua composição:

- Macronutrientes – nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre.

O nitrogênio é adicionado em grande quantidade e pode estar presente na forma de nitrato (NO_3^-) ou amônia (NH_4^+), ou em combinação dos dois íons, ou ainda, na forma de aminoácidos. A fonte de nitrogênio, tanto em termos de quantidade como em qualidade, tem demonstrado afetar o rendimento em biomassa (Dicosmos & Misawa, 1995), assim como a relação entre amônia e nitrato também afeta a produção de metabólitos secundários (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Sato *et al.* (1996) observaram em seu trabalho com morangos que a concentração total de nitrogênio deve agir como um limitante de crescimento celular quando em concentrações abaixo de um valor crítico, que no caso do morango o valor crítico foi de 14,6 mM.

Os demais sais são adicionados através dos seguintes compostos: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e/ou Na_2SO_4 para enxofre e magnésio; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ou KH_2PO_4 , para o fósforo; KCl_2 e/ou KNO_3 e/ou KH_2PO_4 para potássio; e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ para cálcio (Dodds & Roberts, 1995; Misawa, 1994).

Os fosfatos são usualmente assimilados rapidamente pelas células e estocados no vacúolo (Su, 1995). A concentração de fosfatos no meio tem maior influência sobre a fisiologia e o metabolismo de células vegetais em culturas *in vitro* (Wen & Zhong, 1997). Elevados níveis de fosfatos têm demonstrado aumentar o crescimento celular, porém influencia negativamente a produção de metabólitos secundários (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002, Sato *et al.*, 1996). Srinivasan *et al.* (1995) identificou como sendo o fosfato, o possível nutriente limitante de crescimento de células de *Taxus baccata* em suspensão.

- Micronutrientes – são traços de certos elementos minerais que são requeridos por todas as células. Estão incluídos nesta lista o ferro, o manganês, o zinco, o boro, o cobre, o molibdênio e o cloro (Dodds & Roberts, 1995). Outros micronutrientes encontrados no meio MS são: níquel, cobalto e iodo.
- Vitaminas – são compostos com função catalítica nos sistemas enzimáticos e são requeridos em concentrações reduzidas no meio. Dentre as mais citadas têm-se a tiamina, mio-inositol, ácido nicotínico e piridoxina, as quais estão incluídas no meio MS. Dessas vitaminas, a tiamina é uma das que aparece como essencial para a maioria das plantas, enquanto que o ácido nicotínico e a piridoxina podem estimular o crescimento em muitos casos (Dodds & Roberts, 1995; Misawa, 1994). Dodds & Roberts (1995) citam outras vitaminas que têm sido utilizadas na composição do meio de cultura de células de plantas, como por exemplo, ácido paraminobenzóico, ácido ascórbico, tocoferol, biotina, cianocobalamina, ácido fólico, pantotanato de cálcio e riboflavina.
- Fonte de carbono – os meio de cultura requerem a presença do carbono como fonte de energia e para sintetizar os constituintes celulares (Zhong & Yoshida, 1995), uma vez que as culturas de células vegetais, em sua maioria, não exibem crescimento fotoautotrófico (Fowler, 1982). Acredita-se que o catabolismo de açúcares por células de plantas é similar ao catabolismo usado por outras células heterotróficas (Su, 1995).

A sacarose e a glicose aparecem como sendo os compostos mais utilizados, apesar de células vegetais crescerem em diversas fontes de carboidratos. Fowler (1982) cita que as taxas de crescimento e o fator de conversão em biomassa variam grandemente entre as diferentes fontes de carbono e há uma variação na resposta entre as diferentes culturas de células e a fonte de carbono, como nos cultivos de *Catharanthus roseus*, onde foi verificado conversões de galactose, maltose, lactose e amido em biomassa, apesar de terem apresentado valores inferiores àqueles obtidos com sacarose e glicose. Mas, sob o ponto de vista econômico, outras fontes de carbono devem ser estudadas de forma a baratear o processo industrial.

As concentrações normalmente utilizadas variam entre 2 e 4 % (p/v). Contudo essas concentrações precisam ser otimizadas de acordo com a espécie de planta e o produto desejado (Misawa, 1994). Fowler (1988) cita que a concentração da fonte de carbono no meio afeta o rendimento do produto, sendo que com o aumentando dos

níveis de sacarose existe uma tendência a aumentar a síntese de produto, todavia o efeito da concentração de sacarose sobre a síntese de metabólito não é conhecido. Drapeau *et al.* (1986) verificaram que a concentração de açúcar no meio influencia fortemente a taxa de crescimento e a razão entre peso fresco e peso seco de células de *Dioscorea deltoidea* e de *Catharanthus roseus*.

Em meio de cultivo, parte da sacarose deve ser primeiramente degradada extracelularmente e as hexoses resultantes são, então, absorvidas pelas células. A sacarose é uma importante forma de estocagem de hexoses e é normalmente a principal fonte de carbono para a síntese de polissacarídeos, após sua hidrólise por sacarase e/ou invertase (Martin *et al.*, 2000).

Os carboidratos não só funcionam como fonte de carbono, mas também exercem um importante papel na regulação do potencial osmótico externo (Dodds & Roberts, 1995; Lee & Shuler, 2000).

- Reguladores de crescimento e fitohormônios¹ - são substâncias orgânicas que desempenham uma importante função na regulação do crescimento e atuam tanto estimulando como inibindo, dependendo da sua concentração e de outras características intrínsecas da planta (Teixeira & Marbach, 2000) determinadas por fatores como, espécie da planta, parte da planta em que é aplicado, estágio de desenvolvimento da planta e estágio de desenvolvimento do tecido (Tagliacozzo & Costa, 1998). A atuação dos reguladores de crescimento no processo de crescimento e desenvolvimento de plantas é também dependente da concentração empregada, da interação entre os hormônios (ou reguladores de crescimento) e de vários fatores ambientais (Tagliacozzo & Costa, 1998).

Os reguladores de crescimento são conhecidos por terem os maiores efeitos sobre os metabolismos primário e secundário das plantas (Fowler, 1988, Ertola *et al.*, 1995). As classes de compostos responsáveis por essa função são: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, poliamidas, jasmonatos, ácido salicílico e brassinosteróis (Salisbury & Ross, 1992).

Não existe uma regra para a utilização dos hormônios, tendo estes, efeitos distintos sobre a produção de metabólitos secundários nas diferentes espécies. Usualmente, uma combinação de dois ou mais reguladores de crescimento de diferentes classes é requerida, podendo ser aplicada simultaneamente ou

¹ O termo fitohormônio é reservado para reguladores de crescimento que ocorrem naturalmente nas plantas (Dodds & Roberts, 1995)

seqüencialmente (Gaspar *et al.*, 1996). Auxinas, citocininas e interações auxinas-citocininas são consideradas, geralmente, como sendo as mais importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento organizado em culturas de células, tecidos e órgãos de plantas, e essas duas classes de hormônios são geralmente requeridas (Garpar *et al.*, 1996). Também o tipo e a concentração de auxina ou citocinina ou a relação auxina/citocinina afeta dramaticamente tanto o crescimento como a formação de metabólitos em cultivo *in vitro* de plantas (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). A requisição da concentração de cada fitohormônio varia grandemente de acordo com o tipo de planta que está sendo cultivada, com as condições de cultivo e a forma molecular do regulador de crescimento utilizada (Garpar *et al.*, 1996).

Ketchum *et al.* (1995) verificaram que a suplementação do meio com citocinina e auxina é mais benéfica para o crescimento celular em produção de calo, que o uso somente de auxina. Litz & Jarret (1991) citados por Morales *et al.* (1999) afirma que freqüentemente se induz a formação de calos em explantes cultivados em meio contendo auxina, ou com alta relação citocinina/auxina.

Como auxina, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido naftaleno acético (ANA) são os mais freqüentemente utilizados (Krikorian *et al.*, 1990), em concentrações no meio que variam entre 0,1 e 50 μM (Misawa, 1994; Dodds & Roberts, 1995). Em cultura de tecido, entre as auxinas sintéticas, o 2,4-D é mais utilizado para indução de calo e em culturas em suspensão, enquanto o ANA é utilizado quando a organogênese é requerida (Gaspar *et al.*, 1996).

Alguns pesquisadores citam que elevados níveis de auxina no meio promovem desdiferenciação das células e diminui a formação de metabólitos secundários em algumas culturas, efeito especialmente demonstrado pelo 2,4-D (Dicosmos & Misawa, 1995; Fowler, 1982; Ramachandra & Ravishankar, 2002). Entretanto, Drapeau *et al.* (1986) citam que a biossíntese de diosgenina é aumentada com o aumento de 2,4-D no meio. Auxinas adicionadas em meio sólido estimulam a indução de calo (Dicosmos & Misawa, 1995).

Estão citados abaixo os efeitos das auxinas nas plantas:

- ♦ Estimulam o alongamento celular e o crescimento de caule (Davies, 1987; Leopold & Kiedemann, 1975; Raven *et al.*, 1996; Teixeira & Marbach, 2000)

- ◆ Estimulam a divisão de células cambiais, formando assim o tecido vascular secundário e, na combinação com citocininas, em cultura de tecidos (Davies, 1987; Raven *et al.*, 1996).
- ◆ Estimulam a diferenciação do floema e do xilema (Davies, 1987; Leopold & Kiedemann, 1975).
- ◆ Estimulam a iniciação da formação de raízes adventícias em estacas de caule, o desenvolvimento de ramificação de raízes e a diferenciação de raízes – a aplicação de uma alta concentração de auxina sobre raízes que já estejam crescendo geralmente inibe seu crescimento (Davies, 1987; Salisbury & Ross, 1992; Raven *et al.*, 1996,).
- ◆ Mediam a resposta tropística à luz (fototropismo) e à gravidade (geotropismo) de ramos e raízes (Davies, 1987; Leopold & Kiedemann, 1975; Teixeira & Marbach, 2000).
- ◆ São responsáveis pela repressão apical e crescimento de brotos laterais – dominância apical (Davies, 1987; Leopold & Kiedemann, 1975; Salisbury & Ross, 1992; Teixeira & Marbach, 2000)
- ◆ Promovem o crescimento de muitos frutos, resultante basicamente do alongamento celular. O tratamento da parte feminina das flores não polinizadas de algumas espécies com auxinas possibilita a produção de frutos como tomate, pepino e berinjela (Davies, 1987; Raven *et al.*, 1996).
- ◆ Atrasam a senescência de folhas (Davies, 1987).
- ◆ Podem inibir ou promover a abscisão de folhas e frutos dependendo do momento e posição da fonte de auxina (Davies, 1987; Raven *et al.*, 1996).
- ◆ Atrasam o amadurecimento de frutas. O amadurecimento de frutas está associado ao aumento da taxa de respiração e aumento na produção de etileno. Como o IAA (ácido indol-acético) está associado à formação de etileno (promotor ou inibidor), têm sido sugeridos que o amadurecimento pode estar relacionado a uma diminuição das auxinas, interações de oxigênio e etileno e mudanças no nível de hidroperóxidos (Davies, 1987).
- ◆ Estimulam o crescimento de partes das flores (Davies, 1987)

- ◆ Podem atuar como herbicidas para o controle de invasoras em solos agricultáveis (Raven *et al.*, 1996).
- ◆ Estimulam a produção de etileno a altas concentrações (Teixeira & Marbach, 2000).

Citocininas são compostos derivados da adenina. Cinetina (KIN), benziladenina (BA) e 6-benzilaminopurina (BAP) são as citocininas ocasionalmente utilizadas (Krikorian *et al.*, 1990) juntas com auxinas para indução de calos em concentrações entre 0,1 e 20 μM (Misawa, 1994; Dodds & Roberts, 1995; Davies, 1987). Segundo Fowler (1988), as citocininas parece ter efeito diferente dependendo do metabólito e do tipo de célula.

Os efeitos das citocininas nas plantas se apresentam abaixo citados.

- ◆ Estimulam a divisão celular (Davies, 1987; Leopold & Kiedemann, 1975; Salisbury & Ross, 1992; Raven *et al.*, 1996; Teixeira & Marbach, 2000). Esta é a maior função da citocinina em plantas quando em presença de IAA. Estudos com tecidos de tabaco com a adição de IAA ao meio de cultura produz uma rápida expansão celular, formando células gigantes. A cultura sozinha tem pouco ou nenhum efeito, mas a presença de ambos resulta numa rápida divisão celular, com formação de um grande número de células relativamente pequenas (Raven *et al.*, 1996).
- ◆ Estimulam a morfogênese (iniciação de brotos e raiz, formação de botão) em cultura de tecidos.
- ◆ Através da manipulação da razão entre citocinina e auxina pode-se obter calos, raízes ou ramos, essa possibilidade de regeneração de plantas a partir de calos é uma ferramenta biotecnológica comumente utilizada nos dias de hoje para a seleção de plantas com resistência a seca, estresse por sais, patógenos, herbicidas, etc. (Davies, 1987; Salisbury & Ross, 1992; Raven *et al.*, 1996).
- ◆ Aplicações de cinetinas pode desencadear a formação de gemas laterais a partir da dominância apical (Davies, 1987; Teixeira & Marbach, 2000). Alguns estudos têm demonstrado que esse efeito é mais pronunciado com cinetina, enquanto as demais citocininas provocam mais o alongamento celular (Salisbury & Ross, 1992).
- ◆ Estimula a expansão de folhas resultado do alongamento celular.

- ◆ Citocininas tem mostrado promover um alongamento celular de cotilédones. Quando os cotilédones são separados da planta, eles são removidos de sua fonte natural de citocininas, entretanto quando aplicações exógenas de citocinina são feitas para promover a expansão celular, sendo esta duplicada ou triplicada. Esse crescimento celular é causado pela absorção de água, já que o peso seco dos tecidos não aumenta (Davies, 1987; Salisbury & Ross, 1992).
- ◆ Um estudo comparativo entre folhas separadas da planta demonstra que as folhas que tiveram cinetina na água permaneceram com aparência de frescas e com coloração verde (Davies, 1987; Salisbury & Ross, 1992; Raven *et al.*, 1996). Esse efeito vem da habilidade que as citocininas apresentam em atrasarem o desaparecimento de clorofila e a degradação de proteínas, que são processos que comumente acompanham a senescência das folhas (Horgan, 1990).
- ◆ Pode aumentar a abertura dos estômatos de algumas espécies (Davies, 1987).
- ◆ Citocininas promovem a translocação de nutrientes e substâncias orgânicas (Salisbury & Ross, 1992; Raven *et al.*, 1996).
- ◆ Estimulam o desenvolvimento de cloroplastos.
- ◆ A aplicação de citocininas leva a um aumento na síntese de clorofil e promove a conversão de etioplastos em cloroplastos (Davies, 1987).
- ◆ Estimulam o crescimento de caules e raízes.
- ◆ Quantidades endógenas de citocininas são raramente limitantes sob crescimento normal da planta, mas como resultado de aplicações exógenas de citocinina tem-se um aumento do crescimento desses órgãos (Salisbury & Ross, 1992).
- ◆ Estimulam o alongamento celular nas folhas.
- ◆ Podem causar um aumento do tamanho das folhas e tecidos cotiledonários por um processo envolvendo somente o alongamento celular. Em combinação com giberelinas, as citocininas são hábeis para modificar, de forma acentuada, a forma de folhas em plantas intactas (Horgan, 1990).

Sendo assim, suplementos de citocininas e auxinas são instrumentos na cultura de células vegetais na regulação de divisão celular e formação de órgãos

(Dodds & Roberts, 1995). Entretanto, também é possível cultivar tecidos e células de plantas em ausência de reguladores de crescimento através de processos de habituação (Wu & Zhong, 1999).

2.2.1.2. TEMPERATURA

O crescimento de plantas é notoriamente sensível à temperatura; muitas vezes variações de poucos graus levam a significantes mudanças na velocidade de crescimento. Choi *et al.* (2000) verificaram que o crescimento celular de *Taxus chinensis* é mais afetado em temperaturas elevadas (29°C) que quando submetida a temperaturas mais baixas (20°C). Contudo, a produção de metabólitos secundários foi verificada ser melhor conduzida à 29°C e, em casos como este, em que a produção do composto é independente do crescimento, o método de cultivo em dois estágios é recomendável.

Buitelaar & Tramper (1992) citam culturas que apresentam melhor produção de metabólitos em temperaturas em torno de 35°C, contudo, a viabilidade celular decresce rapidamente nessa temperatura.

Temperaturas entre 17 e 25°C são normalmente utilizadas para indução de calos e crescimento de células em suspensão. Entretanto, cada espécie pode ser favorecida em diferentes temperaturas (Misawa, 1994).

2.2.1.3. AGITAÇÃO E PROJETO DE BIORREATORES

A agitação é um parâmetro importante, pois é ela que promove a distribuição igualitária das células, dos nutrientes e dos produtos através da fase líquida.

A agitação de uma cultura, realizada para aumentar a aeração do meio, pode vir a ser um fator estressante para as células, principalmente quando se trata de culturas com alta densidade celular, onde há necessidade da agitação ser mais vigorosa. Tanaka *et al.* (1988) verificaram uma redução do tamanho de agregados celulares ao aumentar a agitação, em estudos sobre a influência da agitação no comportamento das células. Os pesquisadores observaram também, que a concentração de pectina se apresentava 20% maior em culturas menos agitadas. Contudo, nem todas as espécies ou linhagens são sensíveis à agitação, como *Catharanthus roseus*, por exemplo (Drapeau *et al.*, 1986).

Os projetos de reatores e das pás de agitação são contribuintes do efeito mais ou menos drásticos da força de cisalhamento. Existem células mais resistentes ao estresse provocado pela agitação, em contra partida, dependendo da cultura e da força da agitação empregada, pode ocorrer lise celular.

A morfogênese de tecidos *in vitro* é supostamente dependente de fatores exógenos como fluxo de ar e mistura (agitação) devido a duas evidências: 1) pelo efeito hidrodinâmico direto sobre o formato e função da célula, 2) pelo fluxo induzido que provoca mudanças na taxa de transferência de massa de nutrientes e metabólitos (Sajc *et al.*, 2000).

As células mais velhas são mais sensíveis, pois além de serem maiores em tamanho, os vacúolos que servem para acumular metabólitos secundários, muitas vezes tóxicos, podem entrar em contato com o citoplasma em condições de estresse físico (Taticek *et al.*, 1991).

2.2.1.4. AERAÇÃO

A maioria dos nutrientes requerida para o crescimento e metabolismo celular é altamente solúveis em água e quantidades suficientes podem ser inicialmente incorporadas no meio para suportar o metabolismo de células de plantas por extenso período de tempo. O oxigênio é a maior exceção e necessita ser suplementado durante todo o cultivo. Zhong *et al.* (1995) e Ducos & Pareilleux (1986) citam trabalhos em que foi verificada a necessidade de suprimento de outros gases, como o dióxido de carbono e o etileno.

Fowler (1988) descreve que tanto o dióxido de carbono como o oxigênio são nutrientes-chaves no suporte de crescimento não fotossintético em culturas de células vegetais.

Culturas de *Catharanthus roseus* com adição de CO₂ na aeração apresentaram melhor crescimento celular e menor fase lag em comparação com cultivos sem a adição de CO₂ (Hegarty *et al.*, 1986; Ducos & Pareilleux, 1986), entretanto, essa adição deve ser realizada em concentrações ideais, pois concentrações de CO₂ elevadas têm efeito inibitório sobre o crescimento celular (Hegarty *et al.*, 1986). Os cultivos de *C. roseus* foram realizados no escuro e sendo assim o CO₂ não foi requerido para processos e fotossíntese, sendo incorporado como bicarbonato em ácidos orgânicos e aminoácidos ácidos por ação de fosfoenolpiruvato carboxilase.

A taxa total de consumo de oxigênio é dependente do tipo e velocidade de crescimento do organismo, pH, temperatura, composição e tipo de nutriente, concentração de biomassa (Kozai *et al.*, 1997) e densidade celular (Hegarty *et al.*, 1986). A respiração das células depende fortemente das condições da cultura (Su, 1995).

O requerimento de oxigênio de células de plantas é relativamente baixo para o crescimento celular, podendo o oxigênio ter efeito deteriorativo quando o coeficiente de transferência de massa é muito elevado (Wilson & Hilton, 1995). Contudo, esse requerimento pode aumentar significativamente durante a síntese de metabólitos (Sajc *et al.*, 2000). Pareilleux & Vinas (1983) verificaram um decréscimo na velocidade de crescimento na fase exponencial e do fator de conversão de carboidrato em biomassa, em cultura de *Catharanthus roseus*, quando a taxa de aeração aumentou de 0,12 para 0,465 vvm. O decréscimo do crescimento celular com o aumento da taxa de aeração também foi verificado por Ducos e Pareilleux (1986), sendo que os estudos demonstraram que esse decréscimo se deve à possível falta de CO₂ no meio provocado pelo arraste. Resultados similares foram verificados quando a mesma cultura foi realizada em biorreator tipo *airlift*, mas a toxicidade do oxigênio não foi um fator significativo, tendo em vista que a inibição foi a mesma para ventilação com mistura de gás com baixo conteúdo de oxigênio e ar atmosférico (Hegarty *et al.*, 1986).

Hegarty *et al.* (1986) citam que altas taxa de oxigênio, produzidas por altas taxas de aeração, tem mostrado ser inibitórias para o crescimento de *Catharanthus roseus* e dão três hipóteses para esse fato:

- Alta tensão de oxigênio pode ser tóxica ao cultivo de células, uma vez que concentrações hiperbáricas de oxigênio são tóxicas a todos os organismos;
- Células de plantas produzem diversos compostos gasosos e voláteis importantes para o crescimento celular e a aeração promove o arraste destes;
- A aeração promove o cisalhamento entre as células, o que pode levar a danos físicos.

O uso de antiespumantes, compostos utilizados para o controle de espumas em biorreatores contendo meio líquido, pode ter efeito negativo sobre o *k_{la}* (Kieran *et al.*, 1997). Culturas com altas concentrações de células e alta viscosidade pode reduzir a eficiência à transferência de massa de oxigênio em sistemas líquidos (Kieran *et al.*, 1997).

A vantagem do uso de biorreatores sobre frascos agitados está no controle da concentração de oxigênio dissolvido, o que influencia enormemente a atividade mitótica de células em suspensão (Mavituna & Buyukalaca, 1996).

2.2.1.5. INTENSIDADE LUMINOSA E FOTOPERÍODO

A qualidade do espectro, a intensidade e o período de irradiação luminosa podem afetar a cultura de células vegetais, podendo favorecer ou não a produção de metabólitos secundários (Zhong *et al.*, 1995). Mesmo em culturas não fotossintéticas, tanto a iluminação como o fotoperíodo e a intensidade luminosa podem induzir a produção de enzimas requeridas para o metabolismo secundário (Chattopadhyay *et al.*, 2002). Espera-se que produtos normalmente sintetizados em células fotossintéticas, por causa da mais favorável condição termodinâmica para a sua síntese, sejam ausentes em células não-fotossintéticas sem essas condições (Chattopadhyay *et al.*, 2002).

O controle da morfogênese da planta é diferente de acordo com o tipo de luz emitida pelo diodo. A luz proveniente de lâmpadas fluorescentes é a mais utilizada em sistemas de micropropagação e ela dá uma relativa distribuição horizontal uniforme de densidade de fluxo de fóton fotossintético (PPFD), aspectos que também são altamente dependentes do tipo de recipiente e tampa da cultura.

A produção de muitos compostos do metabolismo secundário por culturas de células vegetais é marcadamente aumentada sob condições controladas de iluminação (Kieran *et al.*, 1997). Yeoman & Yeoman (1996) citam que a luz parece ser um pré-requisito essencial para a acumulação de antocianinas e não essencial para a produção de betalaínas na maioria das culturas de células. Van Den Berg *et al.* (1988) citam que a composição do espectro de luz pode exercer grande influência na síntese de metabólitos secundários.

Van den Berg *et al.* (1988), verificaram uma maior produção de antraquinona quando submeteram a cultura de *Rhamnus purshiana* ao fotoperíodo de 12 horas luz em relação ao mesmo ensaio realizado no escuro e a iluminação contínua reprimiu grandemente a produção do metabólito. Sato *et al.* (1996) também verificaram que a intensidade luminosa é um importante fator para a produção de antocianinas em culturas de morango, mas não exerce influência sobre o crescimento celular. Em

contrapartida, a produção de podofilotoxina por *Podophyllum hexandrum* (Chattopadhyay *et al.*, 2002) foi inibida pelo aumento da intensidade luminosa.

Em culturas em suspensão de *Catharanthus roseus* no escuro houve síntese de ajmalicina, enquanto que serpentina, antocianinas e compostos fenólicos tiveram a síntese reprimida (Knobloch *et al.*, 1982).

Kurata *et al.* (1997) demonstraram que a irradiação luminosa não somente aumenta a produção de alcalóides por *Coffea arabica* em cultura de células em suspensão, como também causa mudanças fisiológicas e metabólicas no crescimento celular, taxa de consumo de açúcar e oxigênio e atividade enzimática, sendo que estes últimos fatores têm seus valores diminuídos com o aumento da intensidade luminosa, devido a um possível processo no qual as células da planta sofrem mudanças para sobreviver ao estresse causado pela luz. Por outro lado, a intensidade luminosa elevada aumenta a atividade da enzima envolvida na produção de purina.

Mesmo com o estímulo da produção de metabólitos secundários de alguns sistemas pelo efeito da luz, a sua integração em operações em larga escala (biorreatores) é problemática (Kieran *et al.*, 1997). É necessária uma alta energia para equilibrar o fornecimento de iluminação, além da energia necessária para promover o resfriamento do conteúdo do biorreator (Yeoman & Yeoman, 1996).

2.2.1.6. POTENCIAL OSMÓTICO

A movimentação de água através da membrana das células é governada pelo valor de potencial reativo de água entre a seiva vacuolar e o meio externo. Os componentes de maior influência sobre a disponibilidade de água são a concentração de ágar, de sais e de açúcares (assimiláveis ou não) presentes. Entre os açúcares não assimiláveis mais utilizados tem-se manitol, sorbitol ou xilitol.

Segundo Takaeda *et al.*, (1998), elevadas pressões osmóticas conduzem a uma compressão de volume celular e conseqüente aumento da concentração dos componentes intracelulares, inclusive de precursores e enzimas que fazem parte do metabolismo secundário, mas por ser um fator de estresse, reduz o crescimento celular (Sato *et al.*, 1996). A condição osmótica do meio também tem um importante impacto sobre a morfologia da célula, o que pode afetar a viscosidade da cultura (Su, 1995).

2.2.1.7. PH

O crescimento ótimo de células de plantas em cultura é obtido, normalmente, em valores de pH entre 5,5 e 6,0. É sabido que muitas vezes o pH do meio de cultivo pode influenciar a disponibilidade de membranas e a liberação de produtos do interior das células para o meio (Yeoman & Yeoman, 1996).

O perfil do pH numa cultura é uma indicação da utilização de nitrogênio e de açúcares pelas células (Lee & Shuler, 2000). Durante o cultivo, o pH decresce durante a assimilação de amônia nos estágios iniciais de cultivo, e aumenta durante o consumo de nitrato (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002; Su, 1995). Essa alteração do pH geralmente não causa efeitos adversos ao crescimento celular ou à produção de metabólitos, e por isso a adição de agentes tamponantes ao meio não é necessária (Su, 1995).

2.2.1.8. DENSIDADE CELULAR

Segundo Kanokwan & Doran (1997), que citam Street (1997), os cultivos submersos de células ou órgãos de plantas devem ser iniciados com concentrações relativamente elevadas de inóculo, uma vez que densidades mínimas de inóculo podem impedir o crescimento celular, ou o crescimento celular pode ser precedido de uma fase lag longa (Zhong & Yoshida, 1995). Quando a densidade de inóculo é suficientemente alta, a fase lag pode ser eliminada e desta forma a velocidade de crescimento máxima pode ser igual à inicial. Os autores também explicam que o valor de densidade ótima é dependente da linhagem celular, composição do meio e outras condições de cultivo. Van Gulik *et al.* (1994) observaram, em cultura de *Catharanthus roseus*, que com densidade inicial de biomassa menor que 1,0 g/L (massa seca) o crescimento ou foi precedido de uma longa fase lag ou não ocorreu. Os autores verificaram, também, que o aumento da densidade do inóculo para aproximadamente 3,5 gms/L, levou à diminuição da diferença entre as velocidades de crescimento inicial e máxima, e explicaram que esse fato pode estar relacionado à maior quantidade inicial de CO₂ produzido pelas células e uma alta densidade de inóculo, que também resulta numa transferência de meio condicionado para a cultura. Halaweish & Tallamy (1998) sugerem que o maior contato das células devido à maior densidade celular favorece a divisão celular.

A densidade celular pode ser um parâmetro-chave na produção de metabólitos secundários, descrevem Lee & Shuler (2000) e Zhong & Yoshida (1995). Todavia, para o uso de densidades elevadas de células deve-se ter atenção especial na concentração de compostos no meio, como sacarose, por exemplo (Akalezi *et al.*, 1999).

2.2.1.9. MEIO CONDICIONADO

Usar meio condicionado significa adicionar parte do meio de cultivo de células em crescimento, ou seja, meio filtrado de células em crescimento, onde pode conter substâncias excretadas pelas células e que sejam importantes para a adaptação das células ao meio novo. Essa técnica tem sido utilizada para promover o crescimento de células de plantas, particularmente em cultivos com baixas densidades de células ou para promover diferenciação celular (Lee & Shuler, 2000).

Em cultivo de células de rosa com diferentes concentrações de meio condicionado, o melhor crescimento foi observado com 25% e 50% (v/v), e foi decrescendo à medida que essa concentração aumentou para 75 e 100% (Sakurai *et al.*, 1997)

2.2.2. ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CULTURA DE CÉLULAS DE PLANTAS

A síntese de metabólitos secundários é fortemente relacionada ao estado fisiológico da célula, o qual é, por sua vez, afetado por regulação do meio de cultura ou por seleção e manipulação genética. Fatores físicos e químicos podem influenciar o metabolismo secundário de células de plantas.

Apesar das dificuldades de produção de metabólitos de plantas por meio de cultura de células vegetais, discutidas no item 2.2, algumas estratégias têm demonstrado efeitos benéficos à obtenção de produtos de valor comercial, e elas estão citadas neste item.

Dentre as técnicas descritas a seguir, Stafford (1991) cita que o ajuste das concentrações de fitohormônios tanto em quantidade como na qualidade é em sua

maioria, o ajuste mais crítico a ser feito e por isso o de maior prioridade para ser investigado.

Algumas das estratégias empregadas para manipulação de rendimento de produtos secundários em suspensão de células de plantas estão listados a seguir:

- Fonte de carbono
 - a) Tipo de carboidrato (+usado sacarose).
 - b) Concentração – o aumento é muitas vezes benéfico e tem sido reportado por diversos autores, como resultado do stress osmótico.
- Fonte de nitrogênio
 - a) Tipo – razão entre amônia e nitrato, inorgânico versus orgânico (Panda *et al.*, 1992).
 - b) Concentração – reduzindo ou removendo a fonte há uma redução ou parada no crescimento e com isso deixa de haver competição entre os metabolismos primários e secundários, aumentando a produção de alcalóides, em muitos casos.
- Fosfatos - Altos níveis de fosfatos inibem a acumulação de alcalóides.
- Fitohormônios - tipo e concentrações de auxinas e citocininas podem ter efeito dramático tanto sobre o rendimento, como e sobre crescimento celular (Panda *et al.*, 1992). Elevadas concentrações de auxinas, principalmente 2,4-D, podem exercer influência negativa no metabolismo secundário.
- Regime de luz - algumas culturas somente crescem no escuro; a luz pode ser muitas vezes um fator crítico na acumulação de produtos secundários.
- Temperatura – tanto a redução, como o aumento na temperatura de incubação pode levar a um aumento na produção do metabólito, mas reduz a taxa de crescimento (Stafford, 1991).
- Imobilização - o contato célula/célula que é induzido pela imobilização pode ser benéfico para a produção de metabólitos secundários (Buitelaar & Tramper, 1992; Verpoorte *et al.*, 1999, Scragg, 1991).

- Estresse osmótico - imposto por altas concentrações de açúcar e sal, pode aumentar a produção do metabólito.
- Precusores - o efeito pode variar. Muitas vezes o efeito é positivo, mas a linhagem de célula é dependente da presença do precursor.
- Elicitores - o tratamento das culturas com filtrados autoclavados de fungos e quitosana podem levar a um aumento no nível de produção. O uso de elicitores abióticos também se mostra eficientes, como sais, radiações UV e outros.
- Engenharia metabólica - o aumento da produção pode ser dada pela manipulação de funções enzimáticas, de transporte e regulatórias das células (Bourgand *et al.*, 2001), ou tornar o fluxo de carbono desejado para o aumento de produto (Verpoorte *et al.*, 1999).
- Engenharia genética - introdução de genes de microrganismos em plantas (Verpoorte *et al.*, 1999)
- Otimização de processo – a adequação da agitação, da aeração, da temperatura e de outros fatores inerentes ao processo favorecem a produção de metabólitos. Processos em duas fases (Collins-Pavao *et al.*, 1996, Wu & Zhong, 1999, Scragg *et al.*, 1990) e em batelada alimentada, também são utilizados como estratégia de aumento de produção de metabólitos (Chen & Zhang, 1997).

O desenvolvimento de estratégias para explorar a habilidade de células de plantas cultivadas *in vitro* para produzir compostos, deve ser um pré-requisito essencial à suplementação no progresso no extenso espectro desses compostos (Buitelaar & Tramper, 1992). Neste sentido, a seguir será dada ênfase à técnica do uso de elicitor, principalmente o emprego de quitosana, e utilização de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo, as quais serão utilizadas neste trabalho.

Para obtenção de melhores produtividades de compostos é feita a seleção de linhagens de células produtoras do metabólito de interesse e de crescimento rápido, podendo se lançar mão de técnicas de modificação genéticas.

2.2.2.1. ELICITORES

Elicitores são compostos que induzem plantas a sintetizarem fitoalexinas a elevados níveis, embora, tem sido reportado que a síntese de outros metabólitos secundários também é estimulada por elicitores (Bhagwath & Hjortso, 2000). Segundo Bourgaud *et al.* (2001), dentre as estratégias usadas para incrementar a produção de metabólitos secundários, o uso de elicitores é uma das técnicas de maior sucesso.

Elicitores têm sido usados para modificar o ambiente no qual as células são cultivadas com o objetivo de perturbar o metabolismo e, então, aumentar o rendimento de um particular composto (Yeoman & Yeoman, 1996), além de reduzir o tempo de processo para alcançar altas concentrações de produto (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002).

A estratégia de elicitação consiste em aplicar fatores de estresse químico ou físico à célula vegetal que irão desencadear a produção do metabólito secundário que não é normalmente produzido. O modo de ação dos elicitores ainda não é conhecido completamente, mas há evidências de que eles induzem a síntese de mRNAs específicos (Ertola *et al.*, 1995).

O efeito de elicitores depende de diversos fatores, como concentração do elicitor, estágio de desenvolvimento da cultura em relação ao tempo de exposição a elicitação, período de contato e tempo de elicitação (Bhagwath & Hjortso, 2000). Brodelius & Pedersen (1993) citam que, com poucas exceções, culturas de células vegetais são mais susceptíveis à elicitação somente durante a fase exponencial de crescimento, e o ponto onde o elicitor é adicionado pode influenciar não somente a resposta quantitativa, mas também o modelo de produção.

Os fatores que levam ao estresse químico ou físico, como radiação UV, exposição ao calor ou frio, etileno, fungicidas, antibióticos, sais de metais pesados e elevadas concentrações salinas têm sido definidos como elicitores abióticos (Yeoman & Yeoman, 1996). Os elicitores também podem ser bióticos, ou seja, de origem biológica, e dentre eles pode-se citar quitosana, micélio de fungos autoclavados, extratos protéicos, glicoproteínas e ácidos orgânicos de baixo peso molecular (Ertola *et al.*, 1995), enzimas inativadas, xantanas e quitosanas (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Bhagwath & Hjortso (2000) citam que os mecanismos de ação dos elicitores bióticos e abióticos são considerados diferentes e que existem diversas hipóteses para estes mecanismos.

É considerado que as primeiras reações da elicitação com elicitor biótico são compostas de reconhecimento do elicitor e sua ligação no receptor protéico específico na membrana plasmática, seguida da inibição da ATPase da membrana plasmática, o que reduz o gradiente eletroquímico de próton através da membrana (Dörnemburg & Knorr, 1995).

Os elicitores bióticos podem ser divididos em dois grupos com base na especificidade de elicitação de fitoalexinas: 1) elicitores específicos são aqueles que têm atividade elicitora diferente em vários cultivares de plantas, dependendo da resistência genotípica a doenças; 2) elicitores não específicos não apresentam atividade diferenciada, são usualmente constituintes comumente encontrados em diversos grupos de microrganismos patogênicos e podem ser importantes no desenvolvimento de respostas de resistências em plantas, como glucanas e substâncias quitínicas (Yoshikawa *et al.*, 1993).

Diversos pesquisadores verificaram aumento na produção de metabólitos secundários utilizando compostos elicitores em cultivo submerso (Bhagwath & Hjortso, 2000; Zhao *et al.*, 2001-a, Bohlmann *et al.*, 1995, Zhao *et al.*, 2001-b; Asada & Shuler, 1989). Bhagwath & Hjortso (2000) verificaram que a elicitação fúngica se mostrou próspera na estimulação do metabolismo secundário, e que a produção do metabólito (tiarubrina A) é dependente da concentração do elicitor e da idade da cultura.

Quitosana tem mostrado ser efetiva como elicitor (Dörnemburg & Knorr, 1995; Gagnon & Ibrahim, 1997). Trata-se de um polímero β -1,4-ligado de D-glucosamina encontrado na parede de micélios de muitos fungos que podem induzir diferentes respostas de defesa em plantas por ser uma substância sinalizante que as plantas reconhecem como indicador da presença de patógeno (Yoshikawa *et al.*, 1993; Köhle *et al.*, 1984). A quitosana também pode ser obtida pela diacetilação da quitina proveniente do camarão.

Brodelius *et al.* (1989) citam que a quitosana é liberada no tecido vegetal pela ação de quitinases ou quitosanases sobre a parede de fungos infectantes e essa quitosana induz reações de defesa das plantas, como, por exemplo, inibir o crescimento de fungos através da inibição da síntese de RNA, induzir a expressão gênica na planta hospedeira, induzir a produção de fitoalexinas, induzir lignificação e a síntese de inibidor de proteinases. No caso do uso como elicitor, a quitosana e outros oligossacarídeos derivados da quitina imitam os efeitos de elicitação de alguns fungos patogênicos (Linden & Phisalaphong, 2000).

Alguns pesquisadores vêm utilizando quitosana com sucesso nos processos de elicitação (Willians *et al.*, 1996; Pearce *et al.*, 1998; Pitta-Alvarez & Giulietti, 1999; Linden & Phisalaphong, 2000)

Em estudos realizados por Willians *et al.* (1996) foram utilizados como elicitores quitina, goma xantana, goma karaya e pectina e dentre estes a quitina foi que demonstrou melhores efeitos na produção de sanguinarina. Estes experimentos demonstraram, também, comportamento típico de culturas elicidadas, onde as culturas apresentam menor crescimento celular, e menores consumos de carboidratos, nitrato e amônia, quando comparadas à cultura não elicidadas. A redução no crescimento celular em culturas de *Catharanthus roseus* elicidadas também foi verificado por Zhao *et al.* (2001-b).

Em ensaios realizados com soja (*Glycine max*), os autores verificaram que a quitosana, além de reduzir a taxa de crescimento celular, induziu o acúmulo de gliceolina. O acúmulo de gliceolina se apresentou maior à medida com o aumento da concentração de quitosana, a qual variou de 50 a 2000 µg/g de massa fresca de célula, e o efeito da quitosana sobre o crescimento celular se torna mais pronunciado para concentrações acima de 200 µg/g de massa fresca de célula (Köhle *et al.* 1984). No mesmo estudo, foi verificado também que as culturas tratadas com quitosana apresentaram um escurecimento celular intensificado após dez dias de incubação, aumento da quantidade de compostos polifenólicos, em comparação com a quantidade de compostos fenólicos de cadeia simples, e que a parede celular apresentou lignina e deposição de calose. A lignina e os compostos polifenólicos formam barreiras para aumentar a defesa contra doenças, por aumentar a resistência da parede celular à degradação enzimática e prevenir a penetração e desenvolvimento de patógenos (Köhle *et al.* 1984).

Pitta-Alvarez & Giulietti (1999) testaram em conjunto com a quitosana o uso de ácidos – acético e cítrico – para baixar o pH do meio e afirmam que do ponto de vista biotecnológico o uso de quitosana e dos ácidos acético e cítrico pode ser relevante em processos de produção em larga escala de metabólitos secundários em cultivo de raízes de *Brugmansia candida*. Dörnemburg & Knorr (1995) também verificaram que polissacarídeos envolvidos em interações entre plantas e microrganismos (quitina, quitosana e pectina) tem apresentado bons resultados na ativação do metabolismo secundário de culturas de *Morinda citrifolia*.

Contrariando todos os trabalhos acima citados, no cultivo de *Marchantia polymorpha*, nem a quitosana nem a quitina favoreceram o aumento da produção de ácidos graxos poli-insaturados (Chiou *et al.*, 2001).

Acredita-se que o grau de acetilação da quitosana é importante para induzir o metabolismo de defesa nas culturas de células de plantas. A origem da quitosana parece ter menor importância no sinal de reconhecimento da célula que a molécula similar de quitina (também utilizada como elicitor) polissacarídeo chave da parede celular de fungos (Dörnemburg & Knorr, 1995).

A quitosana aumenta a permeabilidade da parede celular devido a sua natureza policatiónica (Köhle *et al.*, 1984; Brodelius *et al.*, 1989).

2.2.2.2. SACAROSE

Culturas de células vegetais são geralmente heterotróficas, usando açúcares simples como fonte de carbono (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002) para fornecer energia e componentes da biossíntese (Wu & Zhag, 1999). A sacarose e a glicose são as principais fontes de carbono, apesar de existirem outras fontes utilizadas no cultivo de células vegetais. Em cultivo em suspensão, a taxa de crescimento celular é, usualmente, diretamente correlacionada ao consumo de açúcar (Wu & Zhag, 1999). Wang & Zhong (1999) reportam que a quantidade de massa seca formada em cultura de *Taxus chinensis* é significativamente afetada pela concentração inicial de sacarose, sendo maior a medida que aumenta a concentração do substrato.

Em meios de cultura de células vegetais, normalmente, são utilizadas concentrações de 20 e 30 g/L de sacarose. Panda *et al.* (1992) descrevem que concentrações de sacarose acima de 2 % (p/v) são boas, não somente para aumentar o rendimento de metabólitos secundários, como também aumenta a taxa de síntese de produto.

A manipulação de nutrientes no meio de cultivo está associada à aplicação de estresse à célula que pode reduzir o crescimento e o metabolismo primário e promover a diferenciação e o metabolismo secundário, isto porque rotas dos metabolismos primário e secundário podem competir por precursores comuns (Yeoman & Yeoman, 1996). Concentrações relativamente altas de sacarose podem

ser utilizadas para aumentar a densidade celular e a produtividade volumétrica de metabólitos secundários (Wang *et al.*, 1999; Merillon *et al.* 1984).

No caso da sacarose, existem autores que descrevem efeitos benéficos à produção de metabólitos secundários, tanto em cultivos com baixas (Martinez & Park, 1993) como em elevadas concentrações deste composto (Do & Cornier, 1990; Wang *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1996; Panda *et al.*, 1992).

O aumento da concentração de sacarose favoreceu o aumento da produção de antocianina na cultura de *Vitis vinifera* em suspensão, como resultado do aumento da pressão osmótica (Do & Cornier, 1990) e neste caso a sacarose atuou como agente osmótico e como fonte de carbono. Wang *et al.* (1999), verificaram que o aumento da concentração de biomassa e de taxano (paclitaxel) foi relacionado ao aumento da concentração inicial de sacarose em cultura de *Taxus chinensis*. Da mesma forma Zhang *et al.* (1996) observaram que concentrações iniciais de sacarose relativamente altas (50 g/L) foram benéficas para a hiper-produção de saponina em cultivo em suspensão de *Panax notoginseng*, contudo, culturas com concentração de sacarose de 60 g/L apresentaram uma repressão do crescimento celular. O mesmo comportamento foi verificado por Panda *et al.* (1992) em cultivo de *Holarrhena antidysenterica*. Quando elevadas concentrações de carboidratos são rapidamente consumidas podem estar havendo uma formação de reserva de amido e esse amido nem sempre é depois utilizado, mesmo que a cultura esteja com limitação de carbono (Fowler, 1982). Merillon *et al.* (1984), verificaram que a sacarose presente no meio em concentração de 20 g/L favoreceu a produção de triptofano e triptamina, enquanto que 60 g/L favoreceu a produção de ajmalicina e serpentina em cultura de *Catharanthus roseus*.

Yeoman & Yeoman (1996) descrevem que baixas concentrações de sacarose e reduzidos níveis de nitrogênio também resultaram na elevação da produção de antocianina devido a uma ótima relação C:N determinada pelos autores para a produção deste pigmento. No trabalho executado por Akalezi *et al.* (1999) com *Panax ginseng*, a concentração inicial de sacarose que se mostrou mais eficiente em termos de fator de conversão de sacarose em biomassa foi 30 g/L para inóculo de 3 g/L (peso fresco), contudo para a produção do metabólito os autores verificaram ser melhor utilizar 60 g/L de sacarose.

2.3. ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS

Neste tópico serão abordadas as diferentes etapas da cultura de células vegetais para a produção de metabólitos secundários segundo Bourgaud *et al.* (2001).

A cultura de células vegetais se inicia com a seleção da planta produtora do metabólito de interesse e o clone ou sub-clone que é mais produtor do correspondente composto, uma vez que dentro de uma população de células existem diferenças na estrutura, no tamanho, no cariótipo e no comportamento metabólico, e algumas dessas diferenças podem refletir na natureza do explante a partir do qual a cultura foi iniciada (Yeoman & Yeoman, 1996). Contudo, segundo Bourgaud *et al.* (2001), a maior característica dos compostos secundários é que sua síntese é altamente variável; assim não é certo que um extrato seja um bom indicador do potencial da planta para produção de compostos, por ser possível que o correspondente metabolismo, ou o acúmulo do metabólito, tenha sido reprimido anteriormente à quantificação das moléculas.

Na seqüência, o trabalho da cultura *in vitro* se dá com a formação de calos¹. Esta etapa consiste, principalmente, na determinação do melhor meio ao qual a cultura estará adaptada e especial atenção aos balanços hormonais que governam os mecanismos de diferenciação e desdiferenciação. A síntese e a acumulação de substâncias em cultura de células de planta podem ser aumentadas por mudanças nas condições de cultivo (Yeoman & Yeoman, 1996). A etapa de produção de calos (massa celular) é o período crítico, devido à variação somaclonal verificada nas subseqüentes sub-culturas (repiques e cultivo em meio líquido), onde pode ter afetada a produção dos metabólitos de interesse.

Os calos selecionados em termos de crescimento e produtividade são conduzidos para estudos, em geral em suspensão celular, como rota biossintética, elicitação, imobilização e modificação genética, estudos cinéticos, etc. Dentro do estudo cinético de crescimento celular e produção de metabólitos tem-se, usualmente, uma curva exponencial e a maioria dos metabólitos secundários são produzidos durante a fase estacionária. Este fato pode ser justificado por duas vertentes: uma devido à alocação do carbono nos estágios iniciais, onde o crescimento é muito ativo, se direcionando principalmente para o metabolismo primário; outro, quando o

¹ Existem outras vias de iniciação do cultivo de células de plantas *in vitro*, mas nesse trabalho será enfocado somente o cultivo iniciado a partir da formação de calo.

crescimento cessa, o carbono não é mais necessário em grandes quantidades para o metabolismo primário e compostos secundários são mais ativamente sintetizados. Todavia, alguns produtos secundários são conhecidos por serem associados ao crescimento (*growth-associated*) com células indiferenciadas (Bourgaud *et al.*, 2001). Algumas rotas do metabolismo secundário são somente ativadas durante estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou durante períodos de estresse causados, por exemplo, pelo ataque de microrganismos ou eliminação de nutrientes (Yeoman & Yeoman, 1996).

Uma etapa intermediária entre o estabelecimento de calos e o cultivo em biorreatores pode existir, e muitos pesquisadores estudam a performance da célula em meio líquido em pequenos volumes em frascos cônicos (erlenmeyer) e sob agitação em *shaker* (Yeoman & Yeoman, 1996). Nestas condições, as células e agregados celulares permanecem imersos em uma solução nutrientes com diferenças difusionais das existentes no meio sólido, onde o calo se mantinha.

Estudos em biorreatores representam o estágio final que pode levar a uma possível produção comercial de compostos a partir de cultura de células vegetais. Este assunto terá uma abordagem mais aprofundada no tópico seguinte.

A fase de ampliação de escala em biorreatores de grande porte tem sido reportada como sendo uma fase problemática devido à redução da produtividade que a cultura apresenta, atribuída a vários fatores como estresse ao cisalhamento, suprimento de oxigênio e composição de gás (Pan *et al.*, 2000).

2.4. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS VEGETAIS

A análise cinética é necessária para a predição das velocidades de crescimento celular e de formação do produto e para a determinação das condições de processo de cultivo (Takeda *et al.*, 1998). O estudo da cinética de um processo é realizado sob diferentes condições, de forma a se conhecer as condições mais favoráveis de se conduzir e controlar um processo *in vitro*.

A quantificação do crescimento celular e a determinação dos parâmetros cinéticos de bioprocessos são essenciais para o eficiente e racional desenvolvimento da engenharia de bioprocessos de células de plantas (Ryu *et al.*, 1990) e,

conseqüentemente, para o desenvolvimento de tecnologias de cultivo de células de plantas comercialmente vantajosas.

Tipicamente, os estudos cinéticos são realizados em frascos erlenmeyer com agitação em *shaker* por serem de baixo custo e por possibilitar, com facilidade, a multiplicidade de experimentos, inclusive com replicatas (Pestchanker *et al.*, 1996), além de proporcionar uma eficiente transferência de massa entre as fases líquida e gasosa (Kanokwaree & Doran, 1997).

Existem diversos modelos propostos para predizer o crescimento celular e formação de produto em cultivo de células vegetais, quer este cultivo se dê na forma unicelular (Takeda *et al.*, 1998; van Gulik *et al.*, 1992) ou em *clusters* (Pépin *et al.*, 1999). Os modelos cinéticos podem ser aplicados a cultivos sob diversas condições ambientais e intracelulares, usando um conjunto definido de equações e parâmetros (Takeda *et al.*, 1998).

Apesar das grandes diferenças que existem entre os microrganismos e células vegetais, as quais incluem tamanho e agregação das células e propriedades reológicas do meio, muitos perfis de crescimento celular seguem modelos desenvolvidos para fermentações microbianas (Styer, 1985), como o modelo proposto por Monod (1949). De Gucht & van der Plas (1995) citam que apesar dos diversos estudos realizados, pouco se conhece sobre a cinética de crescimento de células vegetais, mesmo porque, a determinação dos parâmetros cinéticos nem sempre são facilmente determinados, porque os modelos baseados em equações lineares para o consumo de substrato, os quais são freqüentemente utilizados em estudos microbiológicos, têm sido aplicados a um número limitado de estudos de cinéticas de células de plantas.

Estudos de cinética de crescimento são direcionados a processos de desenvolvimento (crescimento) celular, especialização e processos regenerativos.

Assim como os microrganismos, as células vegetais em cultivo em batelada, em sua maioria, exibem uma curva de crescimento com fase lag ou de adaptação, fase log (aceleração) ou exponencial, fase de desaceleração e fase estacionária.

O crescimento celular é usualmente exponencial e a maioria dos metabólitos secundários são produzidos durante a fase estacionária (Bourgaud *et al.*, 2001). Essa falta de produção nas fases iniciais pode ser explicado pela alocação do carbono estar distribuído principalmente para o metabolismo primário – construção de estruturas celulares e respiração – quando o crescimento é muito ativo. Uma outra hipótese é

que, quando o crescimento cessa, o carbono não é tão necessário no metabolismo primário e os metabólitos secundários passam a ser mais ativamente sintetizado (Bourgaud *et al.*, 2001).

Apesar da afirmação anterior, Hagendoorn *et al.*, 1997 verificaram a formação de antraquinona na fase exponencial de crescimento em cultivo de *Morinda citrifolia*, onde se encontram as maiores velocidades de crescimento.

A típica faixa da velocidade de crescimento de células vegetais está em torno de 0,12 a 0,05 dia⁻¹ (Dicosmo & Misawa, 1995), mas podem ser encontrados valores da ordem de 0,4 dia⁻¹ (Van Gulik *et al.*, 1992).

Culturas semi-contínuas são operadas como cultivo em batelada até o crescimento atingir a fase exponencial ou próximo à fase estacionária. Depois, 50 a 80% da cultura é drenada e um novo meio é adicionado. As células remanescentes no biorreator são inóculo para o próximo ciclo. A cinética dessas culturas é cíclica, com uma fase log seguinte a outra.

2.5. BIORREADORES

Como já mencionado anteriormente, estudos em biorreatores representam a última etapa da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais, tecidos ou órgãos de plantas. Os biorreatores permitem a ampliação de escala e o controle das condições de cultivo (Buitelaar & Tramper, 1992), podendo estar acoplado com sistemas de automação, o que reduz as tarefas e custos de produção (Ingram & Mavituna, 2000) e possibilita a produção do composto desejado em escala comercial. Muitas considerações aplicáveis à ampliação de escala em sistemas microbianos são também válidas para sistemas de cultivo de células vegetais, estando incluídos: suprimento de nutrientes, uniformidade de mistura, adequada transferência de gás (neste caso, tanto de oxigênio como de gás carbônico), homogeneidade do sistema durante todo o tempo de cultivo no biorreator (Fowler, 1988), o que pode, em caso de falha, causar sedimentação e morte das células (Bourgaud *et al.*, 2001). Sendo assim, o controle de parâmetros que afetam o crescimento celular e a síntese de produtos é um aspecto essencial no projeto de biorreatores.

Entretanto, a configuração de biorreatores utilizadas para células microbianas nem sempre pode ser usada diretamente para células de plantas, em função das

diferenças já citadas anteriormente, e devido haver diferenças entre as diversas espécies de células vegetais, como, por exemplo, resistência ao cisalhamento e requerimento de oxigênio, a configuração do biorreator tem sido adotada conforme a natureza da célula e tipo de tecido em questão (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002).

A otimização da produção de metabólitos a partir de células de plantas pode seguir os tradicionais processos descritos para microrganismos, com os processos de cultivo em batelada, batelada alimentada (semi-contínuo), perfusão e contínuo. O projeto do processo é governado por (Bourgaud *et al.*, 2001):

- Relação entre crescimento celular e síntese do metabólito de interesse: caso o metabólito seja produzido ao final da fase de crescimento, é lógico considerar um processo em duas etapas, onde o primeiro reator é usado para a formação de biomassa e um segundo para a produção do metabólito (Fowler, 1988; Su, 1995; Bourgaud *et al.*, 2001); por outro lado, quando a produção de um dado metabólito for associada ao crescimento celular, uma única etapa é suficiente para o crescimento das células e recuperação das moléculas (produtos) ao mesmo tempo (Bourgaud *et al.*, 2001) e nesse caso na estratégia da cultura um alto rendimento em biomassa e desejável (Su, 1995).
- A possibilidade de o metabólito ser ou não excretado para o meio: para o caso do metabólito permanecer intracelularmente, é usualmente necessário romper as células para que os produtos sejam recuperados, e esse processo pode ser favorecido por um cultivo em batelada ou batelada alimentada. Produtos extracelulares eliminam a destruição da biomassa, podendo estes ser recuperados a partir do meio de cultivo. Essa característica permite a escolha por um cultivo contínuo, o qual representa maior produtividade frente aos processos em batelada (Bourgaud *et al.*, 2001), entretanto, a operação de um cultivo contínuo com células de plantas é dificultada devido à agregação de células, crescimento lento, adesão superficial e alta viscosidade quando se trabalha com alta densidade celular (Su, 1995). Em função disto, a estratégia de cultivo semicontínuo pode ser adotada como alternativa.

A seleção adequada do biorreator pode ser determinada por muitos fatores, entre eles estão a escala, o mecanismo de mistura, o método de aeração e a resistência das células ao estresse provocado pela força de cisalhamento proveniente da agitação. A maioria dos biorreatores que são usados para o cultivo de células

vegetais é derivada de reatores utilizados para o cultivo de microrganismos (Buitelaar & Tramper, 1992).

Uma série de restrições tem sido mencionada para a execução do projeto de um biorreator para células vegetais: (1) baixa taxa de reação e produtividade; (2) instabilidade das linhagens de células; (3) alta possibilidade de contaminação microbiana; (4) o metabólito secundário é geralmente retido no interior das células; (5) células vegetais são geralmente sensíveis à agitação; (6) em alguns casos os compostos devem ser retirados rapidamente (Ertola *et al.*, 1995).

Para o cultivo de células livres, basicamente dois tipos de reatores são usados: reatores agitados com pás ou hélices, ou seja, os chamados biorreatores mecanicamente agitados, e os reatores pneumaticamente agitados como os reatores *air lifts* e coluna de bolhas (Wilson & Hilton, 1995).

Sistemas de cultivo de células imobilizadas ou ligadas a uma matriz inerte ou podem ser realizados em reatores de leito fluidizado ou de leito fixo, em que as células se movem mais lentamente que o meio ou se mantêm estáticas, respectivamente. Sistemas imobilizados podem operar semi-continuamente ou, na teoria, continuamente (Yeoman & Yeoman, 1996). Os biorreatores em leito fixo apresentam a vantagem de permitirem a manipulação do meio durante cultivos prolongados (Yeoman & Yeoman, 1996) e possibilitam a operação de perfusão com a facilidade de coleta das células, o aumento da interação célula-célula e apresentam baixas taxas de agitação (Kieran *et al.*, 1997).

Culturas de organismos inteiros, brotos, ou raízes necessitam de biorreatores com *design* especial (Yeoman & Yeoman, 1996).

De forma geral, os biorreatores devem ter características de baixa agitação devido aos fatores de sensibilidade da célula vegetal (Fowler, 1988). Dentre os diversos modelos, os biorreatores tipo *air lift* em geral apresentam características de baixa força de cisalhamento, principalmente quando comparado aos reatores mecanicamente agitados (Fowler, 1988, Fischer & Alfermann, 1995). Reatores tipo *air lift* ou de coluna de bolhas não possuem partes móveis para agitação, sendo sua mistura realizada através das bolhas de ar que se movem até o topo do biorreator e provocam uma taxa de agitação relativamente baixa, devido à reduzida velocidade relativa entre o líquido e as bolhas em fluxo concorrente (Sajc *et al.*, 2000). Contudo, os *air lifts* também possuem seus problemas intrínsecos quando usados com células vegetais devido às altas taxas de fluxo de ar que devem ser injetadas diretamente na

cultura para suprir a demanda de oxigênio e promover a agitação do sistema. Esse fluxo de ar pode afetar o rendimento em biomassa, e proporcionar a redução de dióxido de carbono e etileno na cultura a níveis próximos de zero (arraste de CO₂), podendo acarretar mudanças adversas no metabolismo (Buitelaar & Tramper, 1992; Yeoman & Yeoman, 1996, Pan *et al.*, 2000). Em contrapartida, Taticek *et al.* (1990) demonstraram que ao reduzirem a razão de O₂/CO₂ em ensaios realizados com *Eschscholtzia californica*, os rendimentos em biomassa ficaram reduzidos frente às condições normais (ar atmosférico), o que contraria a necessidade de CO₂ estar presente num cultivo heterotrófico.

Como células vegetais apresentam baixo requerimento de oxigênio (máximo requerimento para células de plantas é em torno de 1,8 mmol O₂/L/h, enquanto para leveduras e bactérias é de 10 - 15 e 5 - 90 mmol O₂/L/h, respectivamente), tem-se que resolver entre a necessidade de uma boa homogeneidade de nutrientes e biomassa e a relativa sensibilidade à agitação e a baixa demanda de oxigênio (Fowler, 1988). Taticek *et al.* (1990), através de experimentos com *Eschscholtzia californica*, verificaram que os melhores rendimentos em biomassa foram obtidos em biorreator de coluna de bolhas, comparativamente aos reatores mecanicamente agitados e cultura em *shaker*. Sajc *et al.* (2000) confirmam as vantagens dos reatores tipo *air lift* ou colunas de bolhas, as quais sejam: são capazes de combinar elevadas cargas de partículas sólidas e uma boa transferência de massa com reduzido requerimento energético e simplicidade do projeto. Esse tipo de biorreator pode ser utilizado com sucesso para a propagação de culturas de plantas heterotróficas, fitomixotróficas e fotoautotróficas em suspensão (Fischer & Alfermann, 1995). Uma limitação de reatores do tipo *air lift* e coluna de bolhas reside no fato do possível estresse hidrodinâmico gerado pela aeração-agitação imposta para suprir a necessidade de oxigênio e de homogeneização de sistemas operados com altas densidades de células (Tanaka *et al.*, 1988).

Reatores com tanques mecanicamente agitados nem sempre são apropriados para a propagação de células vegetais (Fischer & Alfermann, 1995) e o projeto das pás é um fator importante para a preservação da viabilidade e capacidade produtiva das células. Buitelaar & Tramper (1992) citam em seu *review* autores que demonstram que a sensibilidade das células vegetais à agitação não é observada em todas as plantas, e ainda citam a possibilidade de adaptação das células ao estresse provocado por esse fator físico.

Taticek *et al.* (1990) obtiveram melhor crescimento celular, dado em massa seca, em reator de coluna de bolhas (17,9 g/L) em comparação com reator agitado mecanicamente (13,3 g/L) e frascos agitados (11,3 g/L).

Fowler (1988) cita que quando a concentração de biomassa ultrapassa os 20 g/L (peso seco), algumas restrições começam a aparecer no funcionamento dos biorreatores que possuem funcionamento a ar, em particular as bolhas não se separam na cultura com conseqüente impedimento de circulação da cultura, e há desenvolvimento de regiões sem agitação, havendo formação de um sistema multifásico prejudicial à célula.

Capítulo III

Material e Métodos

3.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Neste capítulo são apresentados os equipamentos e as metodologias utilizadas para a realização dos ensaios experimentais propostos neste trabalho de doutorado.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica com suporte material do Laboratório de Biotecnologia – Micropropagação vegetativa, ambos pertencentes à Universidade Regional de Blumenau – FURB.

Para alcançar o objetivo central do trabalho de otimização da produção de biomassa e safrol utilizando ensaios em biorreator aerado tipo coluna de bolhas, foi necessário realizar estudos de otimização de meio de cultura em termos de reguladores de crescimento para a formação de massa celular (calos) e estudos de conservação da viabilidade germinativa de sementes de pimenta longa.

As melhores condições de conservação da manutenção da viabilidade germinativa de sementes de pimenta longa foram determinadas por meio de estudos de secagem e armazenamento sob temperaturas e umidades diferentes.

No estudo de obtenção de material celular foram realizados experimentos utilizando combinações de reguladores de crescimento, sendo sempre uma auxina e uma citocinina. Foram testadas duas auxinas, o ácido 2,4 diclorofonexiacético (2,4-D) e ácido α -naftalenoacético (ANA), e duas citocininas, a cinetina (KIN) e o 6, benzilaminopurina (BAP), em meio Murashige & Skoog (1962).

Para o conhecimento do comportamento das células de pimenta longa em meio submerso com e sem elicitor (quitosana) foram realizados ensaios em agitadores orbitais, onde foram determinadas as curvas de crescimento celular e de consumo de substrato (sacarose).

Em biorreatores aerados foram realizados cultivos sob condições semelhantes às utilizadas em frascos agitados.

3.2. ESTUDO DA VIABILIDADE GERMINATIVA *IN VITRO* DE SEMENTES DE PIMENTA LONGA

3.2.1. Estudo da influência da temperatura de secagem e de armazenamento sobre a viabilidade germinativa

A necessidade de sementes com viabilidade germinativa durante o ano todo foi verificada com o andamento dos trabalhos, devido ao curto espaço de tempo em que as sementes de pimenta longa permaneciam viáveis. Para tanto, foram propostos estudos para conservação das sementes, com as metodologias descrita a seguir.

Espiguetas de pimenta longa (Figura 3.1) coletadas na Estação Experimental de Itajaí/EPAGRI-SC (EEI/EPAGRI-SC) nos meses de janeiro a março de 2001 serviram como material vegetal inicial dos ensaios experimentais de viabilidade de sementes.



Figura 3.1 - Espiguetas maduras de pimenta longa *in natura*.

As espiguetas foram desidratadas em estufa com circulação de ar em temperaturas de 35, 42, 50 e 60°C, até umidade aproximada de 14%, conforme recomendação descrita por Pimentel *et al.* (1999). A massa final das amostras correspondente a 14% de umidade foi previamente conhecida através da Equação 3.1. apresentada por Cromarty *et al.* (1985), citada por Gentil *et al.* (2001):

$$M_f = \frac{M_i(100 - U_i)}{(100 - U_f)} \quad (3.1)$$

onde:

M_f = massa da amostra (g) após a secagem;

M_i = massa da amostra (g) antes da secagem;

U_i = Grau de umidade (%) antes da secagem;

U_f = grau de umidade (%) desejada após a secagem.

Para a determinação do grau de umidade (U_i), as espiguetas foram submetidas à secagem completa em estufa a 105°C, por 24 horas, e o cálculo realizado conforme equação 3.2.

$$U_i = \frac{\text{massa total} - \text{massa seca}}{\text{massa total}} \quad (3.2)$$

Para o conhecimento do comportamento da secagem das espiguetas de pimenta longa foram estabelecidas curvas de secagem para as quatro temperaturas, através de um sistema de pesagem *on line* (Figura 3.2). As curvas de secagem são expressas em termos de teor de secagem, definida na equação 3.3.

$$\text{Teor de umidade} = \frac{\text{massa de líquido}}{\text{massa de sólido seco}} \quad (3.3)$$

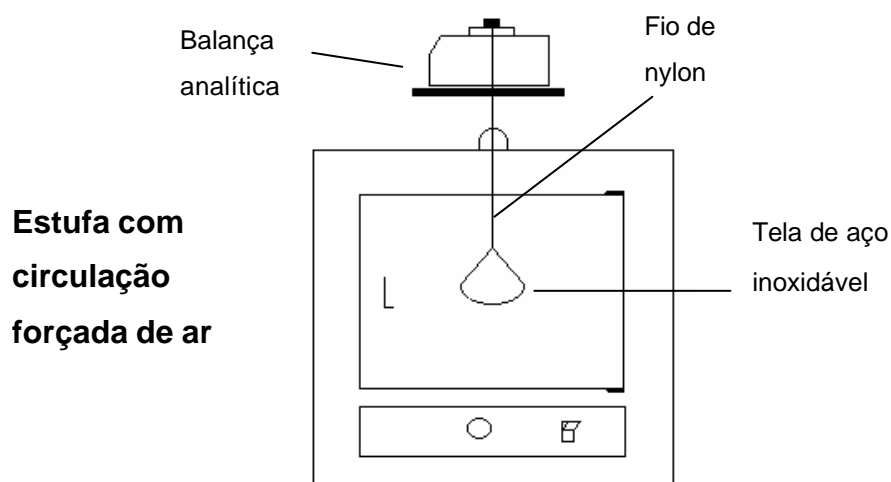


Figura 3.2 – Esquema do equipamento utilizado para a realização dos ensaios de secagem e determinação de massa ao longo do tempo.

Após o processo de secagem, as espiguetas foram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento, colocadas em frascos de vidro de cor âmbar e mantidas sob condições de armazenamento em temperaturas ambiente condicionado (22 – 25°C), de refrigerador (7 – 10°C) e de freezer (~ -18°C).

Nos tempos de 50, 100, 150, 170, 220, 270, e 320 dias de armazenamento foram retirados cinco segmentos de espiguetas armazenados nas diferentes condições de temperatura e submetidos à reidratação em água deionizada, por um período de 24 horas. Em seguida, fez-se a maceração manual das espiguetas para a remoção da mucilagem que recobre as sementes, e, finalmente, por meio de lavagens sucessivas, obteve-se sementes isentas de qualquer sujidade.

Estas sementes foram, então, submetidas à indução da germinação em imersão em água deionizada, a 45°C, durante 15 minutos.

Após a indução, as sementes tiveram sua superfície desinfetada através da imersão em solução de álcool etílico 70% durante 1,5 minuto, seguida da imersão em solução de água sanitária comercial (Qboa) com concentração de 40%, durante 10 minutos. Todo o processo se deu sob agitação em agitador orbital a 130 rpm. Na seqüência, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram enxaguadas por quatro vezes com água deionizada esterilizada em autoclave (121°C/20minutos).

As sementes foram inoculadas em placa de Petri contendo 30 mL de meio de cultura MS¹ - Murashige & Skoog (1962), adicionado de 7 g/L de ágar (Merk) e 30 g/L de sacarose (Difco) e isento de reguladores de crescimento. O pH do meio foi ajustado para 5.8 com adição de solução de NaOH 1M, previamente à autoclavagem.

Em cada placa foram inoculadas de 30 – 40 sementes (Figura 3.3), de forma asséptica em câmara de fluxo laminar, e mantidas, posteriormente, em estantes de crescimento sob condições controladas de iluminação (3600 Lux), fotoperíodo (16 horas) e temperatura (26 ± 2°C).

Os tratamentos com combinações de temperatura de secagem e armazenamento foram realizados em 6 repetições por tratamento, com desenho experimental em blocos inteiramente casualizados.

A avaliação da viabilidade germinativa das sementes de pimenta longa se deu através de contagem do número de sementes germinadas em 10, 15 e 20 dias após a inoculação das sementes e através da observação visual das condições fenotípicas

¹ composição do meio se encontra no Anexo I

(coloração, tamanho, morfologia de folhas e raízes, aparência geral das plantas e desenvolvimento) das microplantas advindas das sementes submetidas aos processos de secagem e armazenamento.

Foi considerado como germinadas, as sementes que demonstraram a saída da radícula através do tegumento (Carvalho, 1988).

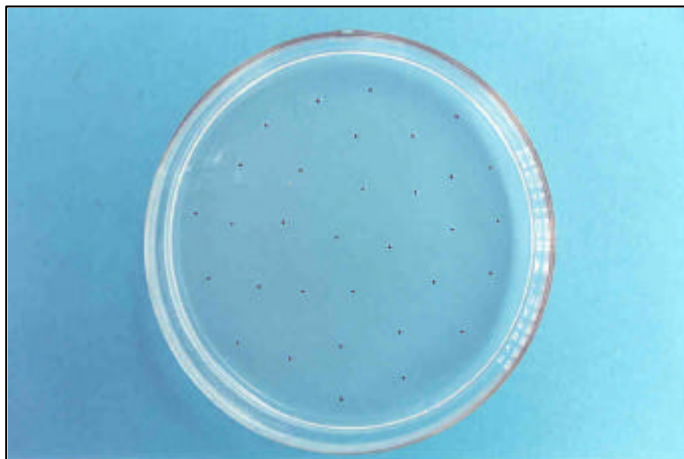


Figura 3.3 - Placa de Petri contendo meio MS e sementes de pimenta longa, logo após a inoculação.

As microplantas obtidas a partir da germinação de sementes (Figura 3.3) foram utilizadas como fornecedoras de explantes de folhas para a formação de massa celular.

3.2.2. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TEOR DE UMIDADE E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DAS ESPIGUETAS SOBRE A VIABILIDADE GERMINATIVA DAS SEMENTES

Os experimentos foram conduzidos de forma semelhante ao processo descrito no item 3.2.1, sendo que o processo de secagem foi realizado em temperatura constante de 42°C, em estufa com circulação de ar, e, à medida que as espiguetas atingiam umidades de 10, 15, 20, 28, 38 e 45%, o processo foi parado e as sementes conduzidas ao armazenamento em freezer e em geladeira.

Foram realizadas contagens das sementes germinadas *in vitro* após 10, 15, 20, 26, 31 e 44 semanas de armazenamento em freezer e em geladeira.

O processo de germinação seguiu o mesmo procedimento descrito no item anterior. A contagem das sementes germinadas realizou-se aos 20 dias após a inoculação das sementes.

3.3. OTIMIZAÇÃO DO USO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO PARA A FORMAÇÃO DE MASSA CELULAR

Para a formação regular de calos (massa celular) de *Piper hispidinervium* foi necessário um estudo prévio das concentrações adequadas de reguladores de crescimento. Esse estudo contou com a realização de 41 ensaios com diferentes concentrações de uma auxina e uma citocinina e 1 isento de reguladores de crescimento. Para efeito de comparação, foi realizado um ensaio com um meio de cultura com combinação de reguladores de crescimento sugerida por Araújo (1998), denominado MC24. As combinações de reguladores de crescimento testadas estão apresentadas na Tabela 3.1.

Conforme estudos realizados no Laboratório de Biotecnologia – Micropropagação vegetativa do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Regional de Blumenau, utilizou-se como explantes para os ensaios, folhas de microplantas provenientes da germinação *in vitro*.

A indução de calo se deu com explante de folhas com aproximadamente 1 cm de comprimento de microplantas oriundas de germinação *in vitro* (Figura 3.4). As folhas, depois de isoladas, sofreram cortes do ápice e do pecíolo (cortes transversais nas extremidades) e foram inoculadas em tubo de ensaio (Figura 3.5) contendo meio MS suplementado com sacarose (30g/L), ágar (7g/L) e combinações de reguladores de crescimento (2,4-D, ANA, KIN e BAP) conforme descrito na Tabela 3.1. O pH do meio foi ajustado em 5,8 com a adição de solução de NaOH 1M, anteriormente à autoclavagem.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento com intensidade luminosa de 3600 Lux, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, onde permaneceram por um período de 30 dias. Cada combinação de reguladores de crescimento recebeu um número, sendo que para o meio isento de reguladores de crescimento foi designado o número zero.

Tabela 3.1 – Numeração dos diferentes meios de indução de calo e formação de massa celular.

Ensaio	Reguladores de crescimento		
	Tipo	Concentração mássica (mg/L)	Concentração molar (mM)
MS0	Isento de reguladores de crescimento		
MS1	2,4D	1,50	6,78
	KIN	0,50	2,32
MS2	2,4D	2,50	11,31
	KIN	0,50	2,32
MS3	2,4D	5,00	22,62
	KIN	0,50	2,32
MS4	2,4D	7,50	33,93
	KIN	0,50	2,32
MS5	2,4D	10,0	45,25
	KIN	0,50	2,32
MS6	2,4D	1,50	6,78
	BAP	1,53	6,78
MS7	2,4D	2,50	11,31
	BAP	2,55	11,31
MS8	2,4D	5,00	22,62
	BAP	5,10	22,62
MS9	ANA	1,26	6,78
	KIN	0,50	2,32
MS10	ANA	2,10	11,31
	KIN	0,50	2,32
MS11	ANA	4,20	22,62
	KIN	0,50	2,32
MS12	ANA	6,30	33,93
	KIN	0,50	2,32
MS13	ANA	8,43	45,25
	KIN	0,50	2,32
MS14	ANA	1,26	6,78
	BAP	1,53	6,78
MS15	ANA	2,11	11,31
	BAP	2,55	11,31
MS16	ANA	4,20	22,62
	BAP	5,10	22,62
MS17	2,4D	1,50	6,78
	KIN	1,00	4,64
MS18	2,4D	2,50	11,31
	KIN	1,00	4,64
MS19	2,4D	5,00	22,62
	KIN	1,00	4,64
MS20	2,4D	7,50	33,63
	KIN	1,00	4,64

Continuação da Tabela 3.1 - Numeração dos diferentes meios de indução de calo e formação de massa celular.

MS21	2,4D	10,0	45,25
	KIN	1,00	4,64
MS22	ANA	1,26	6,78
	KIN	1,00	4,64
MS23	ANA	2,10	11,31
	KIN	1,00	4,64
MS24	ANA	4,20	22,62
	KIN	1,00	4,64
MS25	ANA	6,30	33,93
	KIN	1,00	4,64
MS26	ANA	8,43	45,25
	KIN	1,00	4,64
MS27	2,4D	0,50	2,26
	KIN	0,25	1,16
MS28	ANA	0,42	2,26
	KIN	0,25	1,16
MS29	2,4D	0,50	2,26
	BAP	0,51	2,26
MS30	ANA	0,42	2,26
	BAP	0,51	2,26
MS31	2,4D	5,00	22,62
	KIN	5,00	23,23
MS32	2,4D	10,00	45,25
	KIN	5,00	23,23
MS33	2,4D	2,50	11,31
	KIN	5,00	23,23
MS34	2,4D	7,50	33,93
	KIN	5,00	23,23
MS35	2,4D	1,50	6,78
	BAP	2,55	11,31
MS36	2,4D	1,50	6,78
	BAP	5,10	22,62
MS37	2,4D	5,00	22,62
	BAP	10,18	45,25
MS38	ANA	1,26	6,78
	BAP	2,55	11,31
MS39	ANA	1,26	6,78
	BAP	5,09	22,62
MS40	ANA	4,21	22,62
	BAP	10,20	45,25
MC24	2,4D	2,00	9,05
	BAP	1,98	8,88
	KIN	3,00	13,95

Os parâmetros avaliados neste experimento foram: coloração, friabilidade e peso fresco da massa celular, avaliados aos 30 dias de cultivo.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, com 42 tratamentos e 15 repetições por tratamento, sendo considerado uma repetição cada tubo de ensaio contendo 2 explantes /tubo (Figura 3.5).



Figura 3.4 – Placa de Petri contendo microplantas de pimenta longa, 60 dias após a inoculação.



Figura 3.5 – Tubo de ensaio contendo dois explantes de folhas de microplantas de pimenta longa.

Depois de estabelecido o meio de cultivo adequado para a formação de massa celular, os explantes foram inoculados em número de 15 a 18, em vidros de conserva (Figura 3.6). Da mesma forma que foi conduzido em tubos de ensaio, os explantes

sofreram cortes do ápice e do pecíolo e depois de inoculados foram colocados em câmara de crescimento.

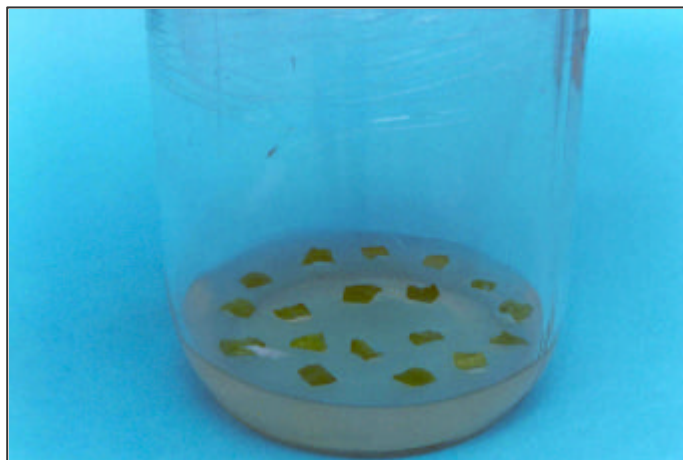


Figura 3.6 – Vidro de conserva contendo explantes de folhas de microplantas de pimenta longa.

3.4. ENSAIOS EM MEIO LÍQUIDO

3.4.1. ESTRATÉGIA PARA MEDIDA DE MASSA CELULAR

Para a transferência do material vegetal a ser inoculado no frasco erlenmeyer e no reator foram construídos recipientes com volumes padronizados em aço inoxidável, os quais foram denominados medidas padrão - MP (Figura 3.7). Com o auxílio das MP foram realizadas medidas de volume de células frescas, as quais foram convertidas em grama de célula fresca (gmf) e seca (gms) por meio de uma calibração da massa média contida na MP.

Essa metodologia está sendo apresentada como substituição à pesagem em balança, dada a dificuldade de manutenção de um ambiente isento de contaminação no interior do fluxo laminar, devido à presença da balança analítica, a qual é de difícil assepsia.

A MP maior foi utilizada como medida em todos os ensaios em meio líquido, sendo que a massa de célula contida possui em média 3,25 gmf ou 0,1 gms.

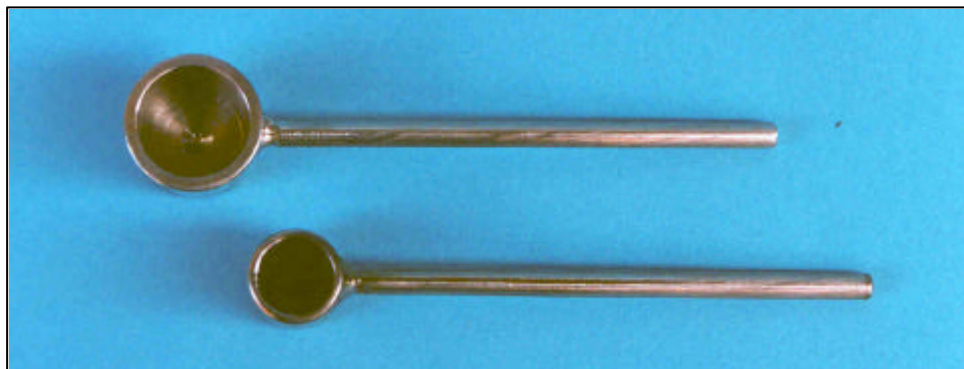


Figura 3.7 – Medidores padronizados de aço inoxidável.

3.4.2. ENSAIOS EM FRASCOS AGITADOS

3.4.2.1. ENSAIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE SACAROSE

Com intuito de conhecer o efeito da concentração inicial de sacarose sobre o crescimento das células de *P. hispidinervium* em meio líquido, foram realizados cultivos em frascos agitados.

Para tanto foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio MS¹ adicionado de sacarose nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 50 e 60 g/L. O pH do meio foi ajustado em 5,8 adicionando-se solução de NaOH (1M) anteriormente à autoclavagem.

Foi utilizado como inóculo aproximadamente 3,25 gmf de células provenientes de calos formados a partir de explantes de folhas. A inoculação ocorreu com auxílio da MP.

As culturas foram incubadas durante 30 dias sob agitação de 100 rpm em agitador orbital (Tecnal TE 420) a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ sob regime de fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro com intensidade luminosa de 2500 Luz no período claro.

Cada ensaio foi realizado em quintuplicata, sendo quatro amostras utilizadas para a determinação de massa seca e um para a determinação da viabilidade celular. No meio de cultura foi determinada a concentração de carboidratos totais ao final do ensaio.

3.4.2.2. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

Foram realizados ensaios em frascos erlenmeyer de 250 mL agitados em agitadores orbitais contendo 100 mL de meio líquido com a mesma concentração de reguladores de crescimento estabelecida no meio de cultivo para a formação de calo (item 3.2). Nestes ensaios serão estabelecidas as curvas de crescimento celular de células de pimenta longa.

Três tratamentos foram realizados, os quais sejam:

- meio MS37 sob intensidade luminosa de 2500 Lux, fotoperíodo de 16 horas luz/dia;
- meio MS37 no escuro;
- meio MS37 sob intensidade luminosa de 2500 Lux, fotoperíodo de 16 horas, adicionado de 1,8 mg/ gmf de célula.

Células provenientes de calo de segmentos foliares de pimenta longa foram inoculadas com auxílio da MP, cerca de 3,25 gmf de célula, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio MS adicionado de 30 g/L de sacarose e pH ajustado em 5,8, anteriormente à autoclavagem.

Cada ensaio foi realizado com 20 – 22 frascos, sendo que a cada amostragem um frasco foi “inaugurado”, onde foram efetuadas as determinações de concentração celular (massa seca), análise de safrol na massa celular seca e análises de carboidratos totais, de carboidratos redutores totais e de glicose no meio, e pH no meio de cultivo.

O tempo de ensaio variou entre 42 e 52 dias.

3.4.3. ENSAIOS EM BIORREATORES AERADOS

Duas configurações de reatores foram empregadas neste trabalho, sendo ambos com injeção de ar comprimido.

A metodologia empregada para a etapa de cultivo de células em biorreator aerado está apresentada a seguir.

3.4.3.1 MEIO DE CULTIVO

Foi empregado o meio de cultivo MS37 adicionado de 30 g/L de sacarose e pH ajustado em 5,8, anteriormente à autoclavagem. O meio MS37 contém em sua composição 5 mg/L de 2,4-D e 10,2 mg/L de BAP.

3.4.3.2. BIORREADORES

Os dois biorreatores com injeção de ar comprimido, caracteriza-se como biorreatores de coluna de bolhas. A construção dos biorreatores é toda em vidro borosilicato.

O biorreator I (BI) consta de um balão de fundo chato de vidro com 250 mL de capacidade máxima, conectado através de mangueiras de silicone, a dois umidificadores em série, construídos em erlenmeyers de 500 mL cada, e dois filtros. Na saída do biorreator há uma mangueira de silicone imersa em uma solução de hipoclorito de sódio para impedir a entrada de microrganismos contaminantes por refluxo. A entrada de ar comprimido no biorreator e no umidificador se dá na parte central do frasco e conta com a extremidade construída em vidro sinterizado, o que permite a redução do tamanho das bolhas de ar para garantir uma melhor transferência de oxigênio para o meio líquido, e melhor umidificação do ar, no caso do umidificador (Figuras 3.8, 3.9 e 3.10). Foram colocados dois umidificadores no sistema para limitar as perdas evaporativas no reator.

Para cada entrada de ar comprimido, três conjuntos de umidificadores, filtros e biorreatores ficaram conectados em paralelo, permitindo a realização de experimentos em triplicata. O laboratório de Reatores Biológicos da Universidade Regional de Blumenau conta com 9 biorreatores do tipo BI.

Os biorreatores ficaram dispostos em sala de crescimento com controle de iluminação (~3600 Lux), fotoperíodo (16 horas) e temperatura ($26 \pm 2^\circ\text{C}$).

Os ensaios foram realizados em triplicata, em 180 mL de meio MS37, com aeração aproximada de 0,3 vvm, regulada com auxílio de um bolhômetro. A massa de inóculo, proveniente de calo, com 40 dias, formados de explantes de folhas de pimenta longa, foi em torno de 2 gmf.

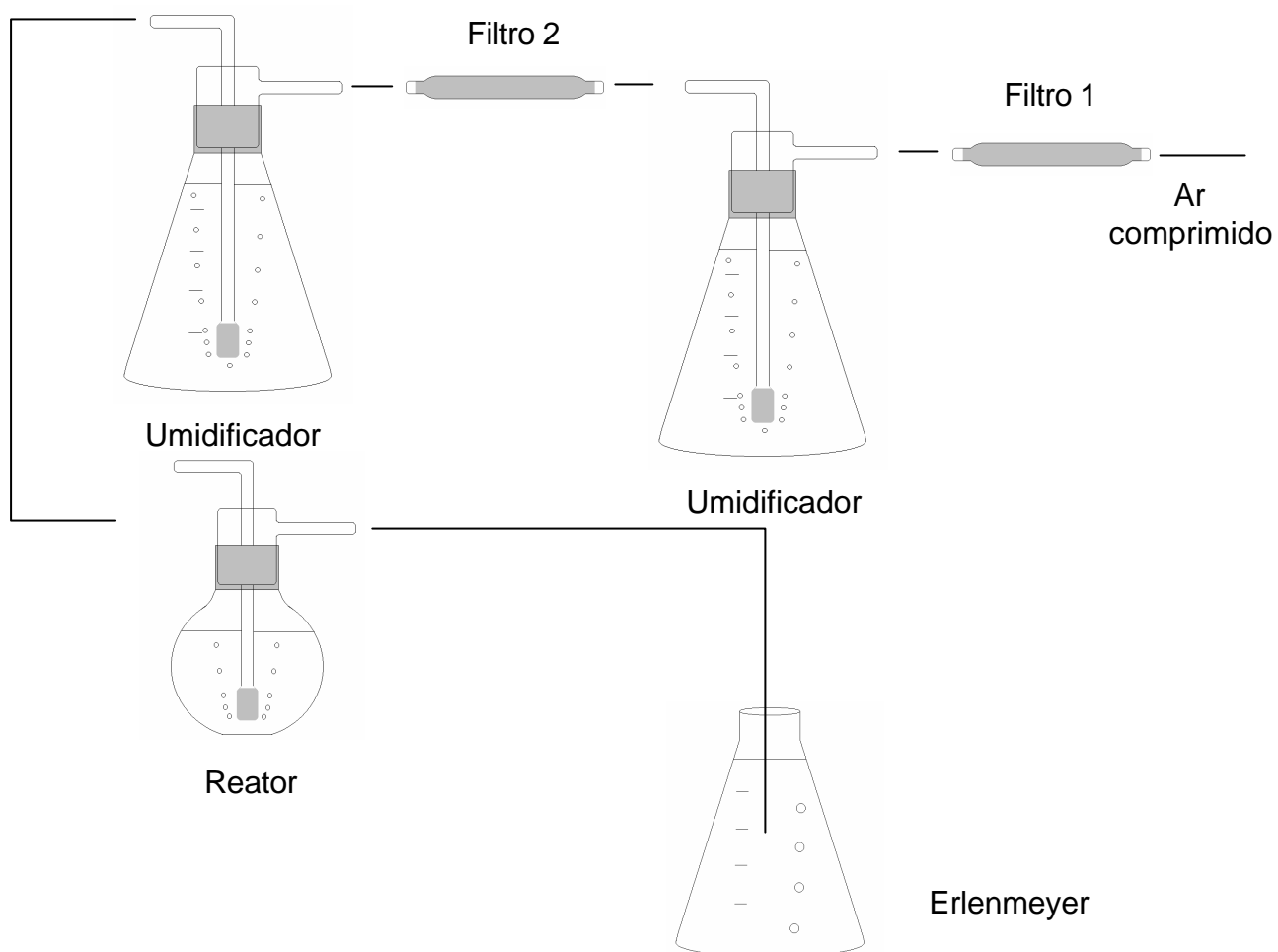


Figura 3.8 – Esquema da instalação do reator de balão de fundo chato.



Figura 3.9 – Aparelhagem em vidro contendo o biorreator, dois umidificadores e dois filtros de algodão.



Figura 3.10 – Biorreator de balão de fundo chato de vidro e aeração central (B I).

O biorreator II (BII), com capacidade de 1 litro, é tubular com entrada de ar comprimido na parte inferior, com projeto sugerido por Taticek *et al.* (1990), o qual está apresentado na Figura 3.11. Da mesma forma que no biorreator BI, o ar que entra deve estar saturado em água para evitar a remoção de água do meio de cultivo. Para que isso aconteça, o ar passa anteriormente por umidificadores. O sistema conta, também, com dois filtros de algodão conectados em série, estando dispostos da seguinte forma, filtro, umidificador, filtro, umidificador e entrada no biorreator. O ar que sai do biorreator passa através de uma solução de hipoclorito de sódio para evitar contaminação de refluxo, antes de ser eliminado para o ambiente.

O biorreator está fixo em um suporte universal e recebe iluminação num dos lados com fotoperíodo controlado. O ambiente onde o biorreator está inserido possui controle de temperatura.

Foram realizados ensaios em 500 mL de meio MS37, com concentração inicial de célula de 45,5 gmf/L e 32,5 gmf/L. A aeração do sistema foi realizada com ar comprimido e ajustada conforme esta se mostrou suficiente para manutenção das células em suspensão.

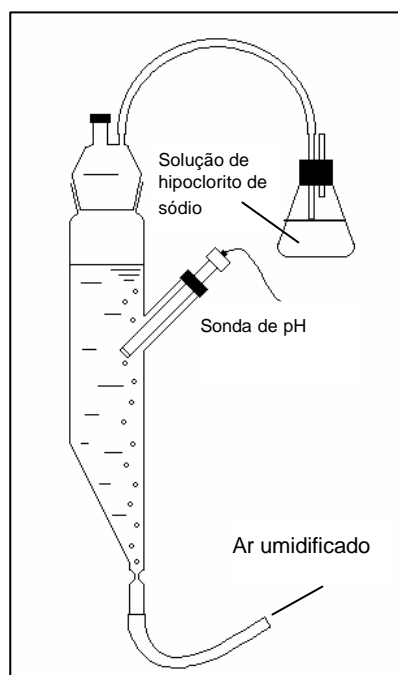


Figura 3.11 – Biorreator de coluna de bolhas tubular (BII)

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1. DETERMINAÇÃO DA MASSA CELULAR

As células foram separadas do sobrenadante por filtração à vácuo com membrana de éster de celulose com diâmetro de 47 mm e 1,2 μm de porosidade (Millipore) e, posteriormente, submetidas a secagem em estufa à 80°C durante 24 horas e pesadas em balança analítica (ANA-AR200).

3.5.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS TOTAIS

Os carboidratos totais residuais no meio de cultivo foram determinados utilizando-se o método de Antrona (Passos, 1996).

O método consta da adição, em tubo de ensaio com tampa de rosca, de 1 mL de amostra previamente diluída em 5 mL de reagente de antrona (0,1 g de antrona desidratada dissolvida em 45 mL de ácido sulfúrico concentrado (PA) e 5 mL de água), seguido de aquecimento em banho-maria a 100 °C durante 10 minutos. Depois

de esfriado em banho de gelo foi feita leitura em espectrofotômetro (Metrolab modelo 325BD) a 625 nm.

A quantificação da concentração de carboidratos totais se deu por comparação dos valores de absorbâncias obtidos nas leituras realizadas com as amostras ao da curva de calibração obtida por meio da realização da mesma metodologia com soluções de concentrações conhecidas de glicose (10, 20, 40, 60, 80 e 150 µg/mL).

3.5.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS

A concentração dos açúcares redutores totais do meio de cultivo foi determinada pelo método de Nelson, onde 1 mL do meio de cultivo foi previamente diluído e adicionado de 1 mL de reativo de Nelson (12,5 mL de solução de Nelson A e 0,5 mL de solução de Nelson B) em tubo de ensaio com tampa de rosca, o qual foi aquecido em banho-maria em ebulição por 20 minutos.

À esta solução foi adicionado 1 mL de solução arsenomolibdica, e depois de agitado, juntou-se 5 mL de água e novamente a mistura foi submetida à agitação.

A leitura da intensidade de cor, a qual é proporcional à concentração de carboidratos redutores no meio foi realizada em espectrofotômetro (Metrolab modelo 325BD) a 540 nm.

Da mesma forma que na determinação de carboidratos solúveis totais a quantificação da concentração de açúcares redutores totais se deu por comparação dos valores das absorbâncias obtidas nas leituras realizadas com as amostras ao da curva de calibração obtida por meio da realização da mesma metodologia com soluções de concentrações conhecidas de glicose (10, 20, 40, 60, 80 e 150 µg/mL).

- Reativo de Nelson A - solução de 6,25 g de Na_2CO_3 anidro, 6,25 g de sal de Rochelle, 5 g de NaHCO_3 e 50 g de Na_2SO_4 em 250 mL de água (a diluição ocorreu sob aquecimento).
- Reativo de Nelson B – Solução de 7,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 50 mL de água adicionada de uma gota de H_2SO_4 concentrado.
- Solução arsenomolibdica – Mistura de uma solução de 25 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 450 mL de água adicionada de 21 mL de H_2SO_4 concentrado, com uma solução de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 25 mL de água é adicionado à anterior (o reagente deve apresentar coloração amarela, sem tintura).

3.5.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

A concentração de glicose foi determinada por método enzimático (kit da Bio diagnóstica). O “kit” consta de um reagente contendo enzima glicose-oxidoreductase/peroxidase e solução padrão de glicose com concentração igual a 1 g/l.

O método se fundamenta na oxidação da glicose pela glicose-oxidase (GOD) transformando-a em ácido glucônico e água oxigenada. A peroxidase (POD) é responsável por catalisar a reação da água oxigenada com o hidroxibenzoato e a 4-aminofenazona, formando um composto chamado quinonimina, de coloração vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose presente na solução analisada.

A determinação foi feita adicionando-se em tubo de ensaio 2 ml do reagente de cor e 20 µl da amostra a ser analisada. Simultaneamente são feitos o branco contendo apenas o reagente de cor e os tubos (duplicata) contendo a solução padrão. Todos os tubos eram incubados por 10 minutos à 37°C em banho termostatzado. A leitura foi feita contra o branco em espectrofotômetro (Metrolab modelo 325BD) a 510 nm.

A concentração de glicose foi obtida dividindo-se a absorbância da amostra pela do padrão, multiplicada pela diluição, quando esta era realizada.

A concentração de frutose no meio foi calculada subtraindo-se os valores das concentrações de açúcares redutores totais da glicose e a sacarose a partir da diferença entre os carboidratos solúveis totais e os açúcares redutores totais.

3.5.5. DETERMINAÇÃO DE SAFROL

O safrol foi quantificado na massa celular previamente seca em estufa (OLIDEF CZ) a 80°C durante 24 horas.

O processo de extração do safrol se deu por meio de processo de refluxo durante 4 horas, utilizando-se como solvente cerca de 40 mL de etanol absoluto (Merk). O solvente foi separado do material vegetal por filtração à vácuo e em seguida foi concentrado em evaporador rotativo (Quimis) até volume de 10 mL.

Nas soluções concentradas das amostras foram realizadas as quantificações de safrol, a qual se deu com alíquotas de 20 µL em HPLC (Pro star 230) com detector

UV-VIS (Pro star 310) e com coluna C8 (fase reversa) de 250 mm x 4,6 mm (CHROMSPHER 5 – Varian). A detecção foi feita com comprimento de onda de 282 nm. Foi utilizado como fase móvel uma solução de metanol:água:acetonitrila na proporção de 50:35:15 a uma vazão de 1 mL/min.

Para a conversão das áreas obtidas nos cromatogramas das amostras, foi construída, a cada série de testes, uma curva de calibração com concentrações de safrol variando entre 0,01 e 0,07 % (Figura 3.12).

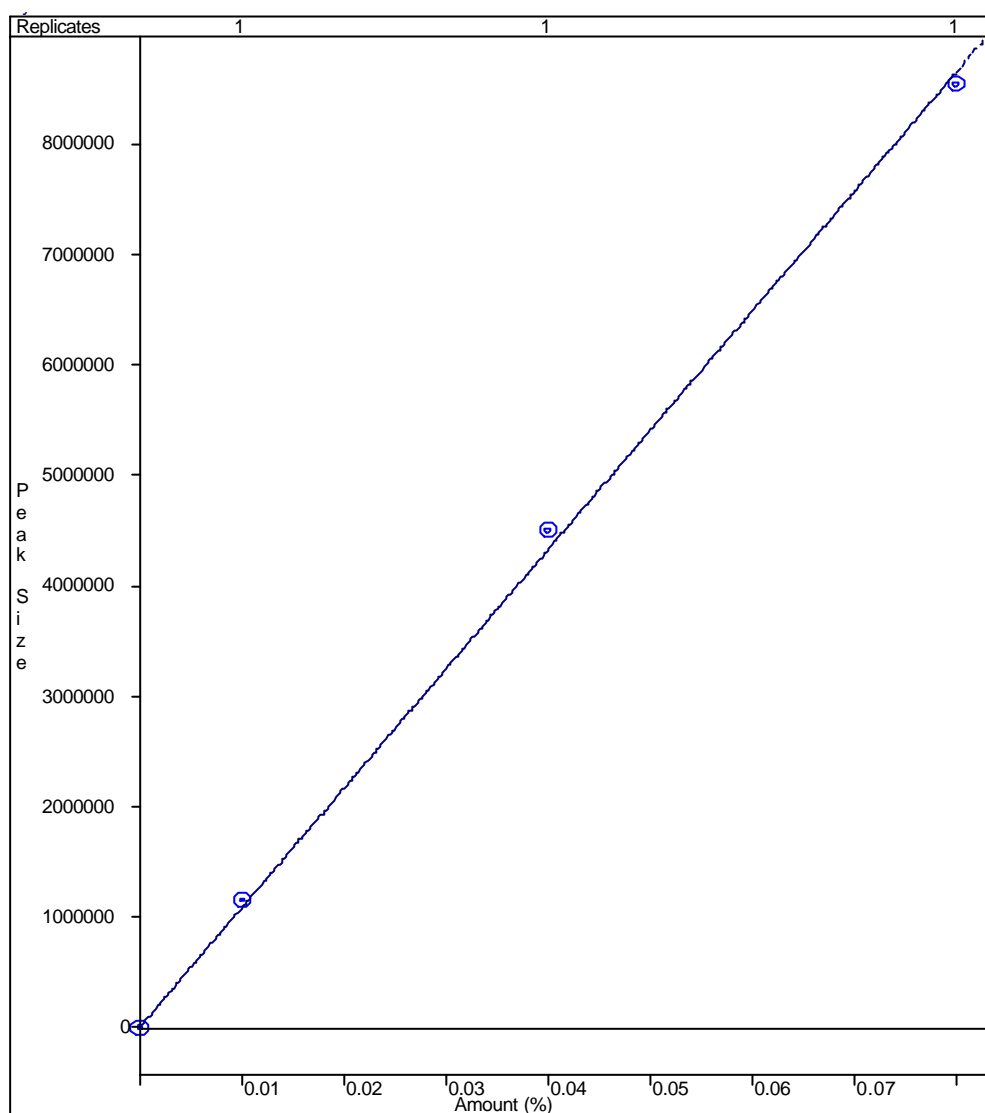


Figura 3.12 - Exemplo de uma curva de calibração de safrol com concentrações entre 0,01 e 0,07 % (p/v).

A Figura 3.13 apresenta o cromatograma da determinação de safrol em amostra contendo 0,01% de safrol PA.

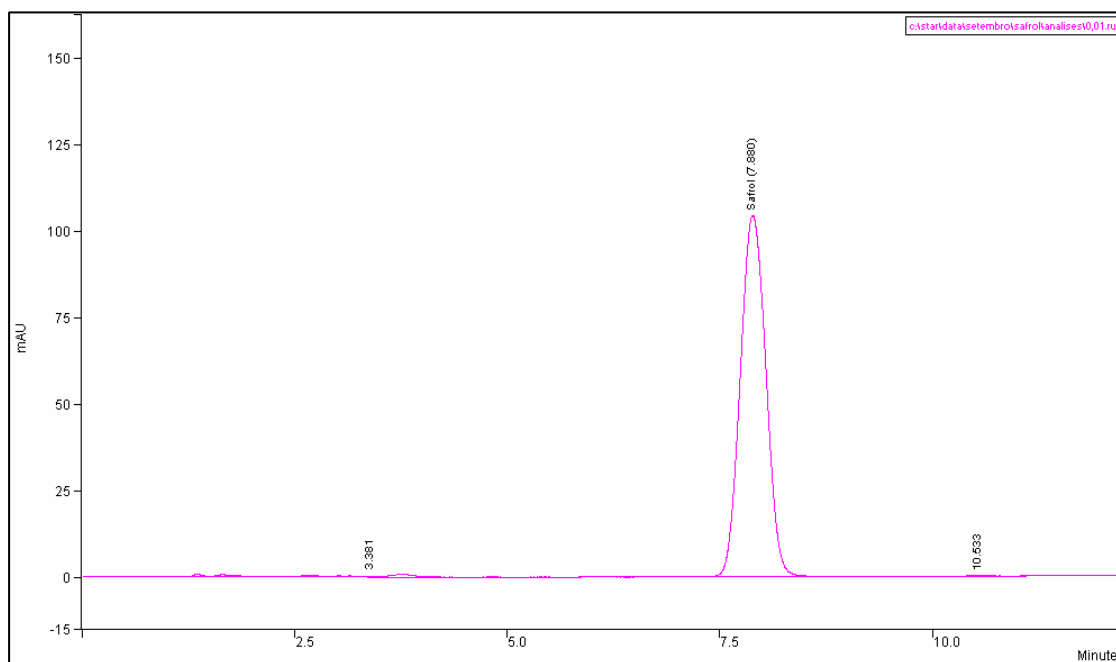


Figura 3.13 – Exemplo de cromatograma de uma solução padrão de safrol PA a 0,01% (p/v).

As determinações de safrol foram realizadas no laboratório de Análises Instrumentais do Instituto de Pesquisas Tecnológicas da Universidade Regional de Blumenau (IPT/FURB).

3.5.6. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Em um tubo de ensaio, 100 mg de tecido vegetal fresco são adicionados a 3ml de reagente de cloreto 2,3,5 trifeniltetrazolio, o qual é preparado com 0,6% (p/v) em solução tamponada ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) com pH 7,4. O tubo é incubado *over night* à 28°C. Após esse período, são adicionados 7mL de etanol 95% (v/v) no tubo. O composto colorido é extraído por meio de fervura em banho-maria durante 4 minutos. A solução é centrifugada para a separação dos sólidos. Mensura-se a absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro à 490nm de comprimento de onda. A viabilidade é expressa como absorbância/g de peso fresco (Benson, 1994).

3.5.7. DETERMINAÇÃO DE PH

Ao início e a cada amostragem dos experimentos foi realizada a determinação dos valores de pH no meio líquido utilizando-se, para tanto, um pHmetro digital.

3.6. CÁLCULO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DO PROCESSO

3.6.1. CÁLCULO DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS

Para o cálculo das velocidades de crescimento celular foi feito um balanço de massa num processo batelada com volume constante, onde a Equação resultante está apresentada abaixo:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad [d^{-1}] \quad (1)$$

onde,

μ_x velocidade específica de crescimento celular [d^{-1}];

X Concentração de célula em massa seca [g/L];

t tempo [d]

Na fase exponencial de crescimento celular a velocidade específica é constante. Assim sendo, as velocidades específicas máximas de crescimento (μ_{max}) foram calculadas através do coeficiente angular da reta obtida relacionando-se o logaritmo neperiano da concentração celular com tempo na fase exponencial de crescimento (Anexo II).

Para traçar as curvas e fazer a regressão linear da reta foi feito uso do programa gráfico Microcal Origin 6.0.

3.6.2. CÁLCULO DE PRODUTIVIDADE EM CÉLULA (P_x)

Foi calculada considerando a formação de massa de célula no tempo de cultivo conforme a Equação 2:

$$P_x = \frac{X_{\text{Máx}} - X_i}{t} \quad [\text{g/L.d}] \quad (2)$$

Onde,

$X_{\text{máx}}$ Concentração máxima de célula em massa seca [g/L];

X_i Concentração de célula em massa seca no início do cultivo [g/L];

t tempo de cultivo [d].

Em função da concentração do inóculo ser próximo a 1 g/L e o tempo de cultivo igual para todos os ensaios, esse parâmetro não foi calculado para os ensaios realizados com diferentes concentrações iniciais de sacarose.

3.6.3. CÁLCULO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO (t_d)

t_d é definido como o tempo necessário para a população duplicar sua massa e foi calculado na fase de crescimento exponencial nos cultivos em que foram determinadas as curvas de crescimento. O cálculo foi realizado utilizando-se a equação (3)

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad [\text{d}] \quad (3)$$

onde,

μ velocidade de crescimento celular determinada sobre a massa seca de célula.

3.6.4. CÁLCULO DAS VELOCIDADES DE CONSUMO DE SUBSTRATO (r_s)

Com base nos valores obtidos de concentração de substrato (S) em função do tempo (t_f) dos cultivos em *shaker*, foram calculadas as velocidades médias de consumo de substrato no instante final t_f (equação 3):

$$r_s = \frac{S_i - S_f}{t_f} \quad [\text{g/L.d}] \quad (4)$$

onde,

S_i concentração inicial de substrato (carboidratos solúveis totais) [g/L];

- S_f concentração final de substrato (carboidratos solúveis totais) [g/L];
 t_f tempo final do cultivo [d].

3.6.5. CÁLCULO DOS FATORES DE CONVERSÃO

3.6.5.1. FATOR DE CONVERSÃO DE CARBOIDRATOS EM CÉLULA ($Y_{X/S}$) DOS CULTIVOS EM SHAKER COM DETERMINAÇÃO DE CURVA DE CRESCIMENTO

O fator de conversão de carboidratos solúveis totais em células foi obtido a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da concentração de célula, contra a concentração de carboidratos solúveis totais (Equação 5):

Para traçar as curvas e fazer a regressão linear da reta foi feito uso do programa gráfico Microcal Origin 6.0. Os gráficos estão apresentados no Anexo II.

$$X_t - X_i = -Y_{X/S} \times (S_i - S_t) \quad [\text{g/g}] \quad (5)$$

Onde,

- X_t concentração de célula em massa seca no tempo t [g/L];
 S_t concentração de substrato (carboidratos solúveis totais) no tempo t [g/L];
 S_i concentração inicial de substrato (carboidratos solúveis totais) [g/L];
 X_i Concentração de célula em massa seca no início do cultivo [g/L].

3.6.5.2. FATOR DE CONVERSÃO DE CARBOIDRATOS EM CÉLULA ($Y_{X/S}$) DOS CULTIVOS EM SHAKER COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE

O fator de conversão de carboidratos solúveis totais em células foi obtido utilizando-se a Equação 6. Para esse cálculo foram utilizados valores médios das concentrações celulares e de substratos determinados entre as triplicatas.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad [\text{g/g}] \quad (6)$$

Onde,

- X_f Concentração de célula em massa seca no final do cultivo [g/L];
 X_i Concentração de célula em massa seca no início do cultivo [g/L];
 S_i Concentração de substrato no início do cultivo [g/L];

S_f Concentração de substrato no final do cultivo [g/L].

3.6.7. CÁLCULO DOS ÍNDICES DE CRESCIMENTO

O índice de crescimento foi calculado utilizando-se a equação 7:

$$IC = \frac{X_f - X_i}{X_i} \quad (7)$$

Capítulo IV

Ensaio Preliminares

Os ensaios preliminares constam dos estudos experimentais realizados para a preservação da viabilidade germinativa de sementes de pimenta longa, de forma a possibilitar a utilização destas durante o período de entressafra. Para tanto foram realizados, num primeiro momento, testes com diferentes temperaturas de secagem das espiguetas. Num outro momento, os processos de secagem foram interrompidos em diferentes tempos de forma a conduzir o processo germinativo com sementes com diferentes conteúdos de água.

Após os processos de secagem, as espiguetas foram armazenadas sob condições ambientes, de geladeira e freezer, de onde foram retiradas as mostras para conduzir as avaliações de germinação *in vitro*.

Os resultados estão apresentados sob a forma de três artigos:

ARTIGO I - Estudo da secagem de espiguetas de pimenta longa (*Piper hispidinervium*).

ARTIGO II - Influência das temperaturas de secagem e armazenamento sobre a viabilidade germinativa de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) *in vitro*.

ARTIGO III - Estudo da influência da umidade de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) armazenadas em condições de refrigeração e congelamento sobre a viabilidade germinativa *in vitro*.

4.1. CURVAS DE SECAGEM

Artigo I

**“ESTUDO DA SECAGEM DE ESPIGUETAS DE PIMENTA LONGA
(*Piper hispidinervium*)”**

ESTUDO DA SECAGEM DE ESPIGUETAS DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium*)

Resumo. A pimenta longa é um arbusto de origem amazônica produtora de safrol, composto importante para as indústrias química e farmacêutica. A conservação das sementes desta planta deve ser feita utilizando-se processo de secagem para atingir umidade de 14%. Este trabalho tem como objetivo estudar o efeito da temperatura sobre o processo de secagem de espiguetas de pimenta longa em estufa com circulação de ar. Para tanto, foram utilizadas cerca de 30 g de espiguetas recém coletadas, as quais foram colocadas em estufa com circulação forçada de ar, onde foram submetidas às temperaturas de 35, 42, 50 e 60°C. Como resultado foi observado que a velocidade de secagem aumenta com o aumento da temperatura de secagem, sendo que os tempos de secagem para que as espiguetas atingissem umidade de 14%, foram de 50 e 6 horas para as temperaturas de 35°C e 60°C, respectivamente.

Palavras chave: Secagem, Semente, Pimenta longa

1. INTRODUÇÃO

A pimenta longa (*Piper hispidinervium*) é um arbusto ramificado, nodoso, com inflorescência em forma de pedúnculos, folhas glabras ou pouco pubescentes, podendo apresentar pontuações glandulares (ROCHA & MING, 2001). Originária da Amazônia, a pimenta longa representa uma das maiores promessas brasileiras para a fitoquímica mundial, devido à possibilidade de substituição sustentável da canela sassafrás (*Ocotea odorifera*) na produção de safrol, com teores acima de 90% deste composto em seu óleo essencial (Sá *et al.*, 1998). O safrol é um componente aromático largamente utilizado pela indústria na composição de fármacos, inseticidas biodegradáveis e cosméticos, e que apresenta alta demanda mundial, chegando a 3000 toneladas/ano (EMBRAPA/AC, 2001).

Sementes são a forma mais comum de conservação *ex situ* (conservação da espécie fora do seu ambiente natural), já que esta é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (Santos, 2000).

Segundo Carvalho (1994) as temperaturas máximas do ar de secagem estariam entre 70 e 80°C, sendo que acima destes valores, as sementes apresentariam problemas fisiológicos, comprometendo ou inviabilizando o processo de germinação.

Este trabalho teve como objetivo estudar a cinética de secagem de espiguetas de pimenta longa em estufa com circulação forçada de ar utilizando diferentes temperaturas de ar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Espiguetas de pimenta longa foram coletadas na EEI/EPAGRI-SC nos meses de janeiro a março de 2001, e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (marca Fanem, mod 320-SE) sob temperaturas constantes de 35, 42, 50, 60°C. O controle da temperatura foi verificado com auxílio de multímetro e termopares.

Para cada ensaio foram utilizados cerca de 30 g de espiguetas inteiras. A umidade média das espiguetas foi determinada através da secagem completa (determinação da massa seca), segundo metodologia apresentada pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Durante o processo foram estabelecidas curvas de secagem das espiguetas para as quatro temperaturas, através de um sistema de pesagem *on line*, conforme apresentado na Figura 1.

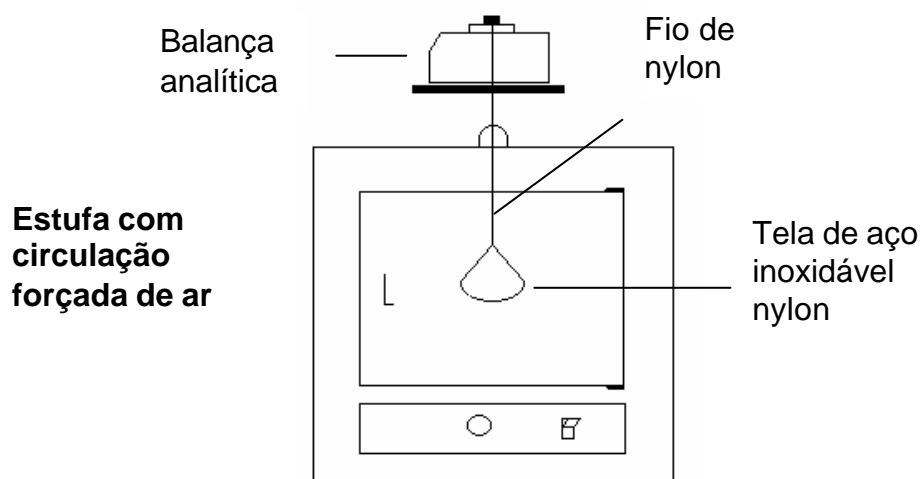


Figura 1 – Esquema do equipamento utilizado para a realização dos ensaios de secagem e determinação de massa ao longo do tempo.

A partir do conhecimento do tempo de secagem necessário para que as sementes atingissem a umidade de 14% obtido nas curvas de secagem, o processo foi

interrompido para garantir a manutenção da viabilidade germinativa das sementes (Pimentel *et al.*, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O processo de secagem consiste na transferência do líquido presente num sólido para uma fase gasosa não saturada. A secagem de um sólido úmido mediante uma atmosfera a uma temperatura e umidade do ar constantes, manifesta sempre um certo tipo de comportamento, o qual está demonstrado nas curvas de secagem das espiguetas de *Piper hispidinervium* realizadas nas temperaturas de 35, 42, 50 e 60°C (Figura 2). As curvas de secagem são expressas em termos de teor de umidade ao longo do tempo para cada tratamento térmico, definido na equação 1.

$$\text{Teor de umidade} = \frac{\text{massa de líquido}}{\text{massa de sólido seco}} \quad (1)$$

Observando o comportamento da secagem das espiguetas de pimenta longa, verifica-se uma diferença apreciável em relação ao tempo de secagem entre a temperatura de 35°C e as demais temperaturas. Os valores, apresentados na Tabela 1, demonstram que para a temperatura de 35°C foi necessário um tempo longo (acima de 50 horas), para que a umidade atingisse a umidade de equilíbrio, enquanto que para as demais temperaturas esses tempos foram muito próximos, não superiores a 23 horas de secagem.

Tabela 1 – Relação dos valores de teor de umidade de equilíbrio e tempo para as temperaturas de secagem de 35, 42, 50 e 60°C.

Temperatura (°C)	Tempo (hora)	Teor de umidade (g/g)
35	50,13	0,1746
42	22,17	0,1710
50	22,67	0,1147
60	19,50	0,0907

Na Tabela 1, pode-se observar também que as umidades de equilíbrio são diferentes entre si, apresentando redução dos valores a medida que a temperatura de secagem aumenta, porém praticamente a mesma para as temperaturas de 35 e 42°C.

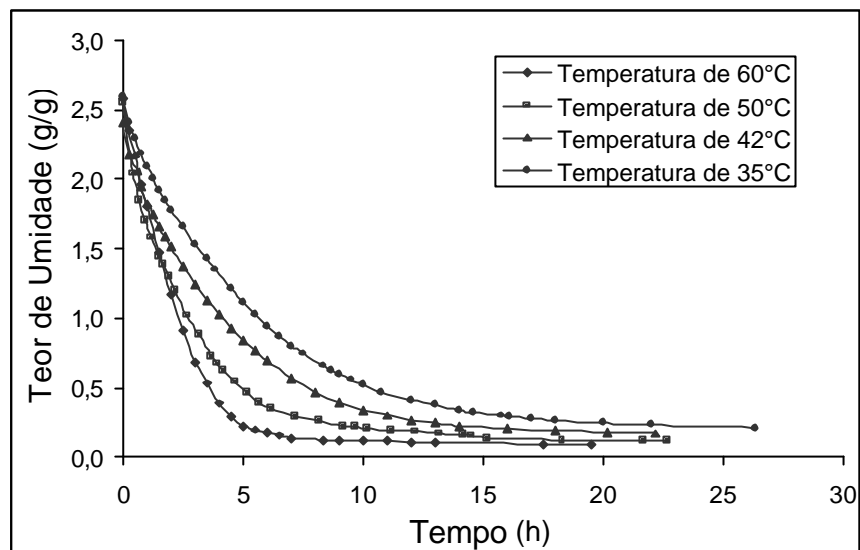


Figura 2 – Efeito da temperatura (35, 42, 50, 60°C) sobre o teor de umidade de espiguetas de pimenta longa.

A manutenção da viabilidade germinativa de sementes é dependente da atuação da temperatura de secagem sobre o embrião e também à percentagem de água final que deve conter as sementes após estas terem sido secas que, segundo Pimentel *et al.* (1999), não deve ser inferior a 14 %. A Tabela 2 mostra a relação entre o tempo de secagem necessário para que as sementes contivessem uma percentagem de água da ordem de 14%.

Tabela 2 – Relação entre tempo de secagem e percentagem de água de sementes de pimenta longa para as temperaturas de secagem de 35, 42, 50 e 60°C.

Temperatura (°C)	Tempo (hora)	Conteúdo de água (%)
35	50,13	14,86
42	22,17	14,61
50	13,17	14,60
60	6,00	14,76

Para calcular as velocidades de secagem, primeiramente transformou-se os dados da Figura 2 num teor de umidade adimensional (X/X_0). As curvas de velocidade de secagem $d(X/X_0)/dt$ em função do teor de umidade adimensional estão demonstradas na Figura 3.

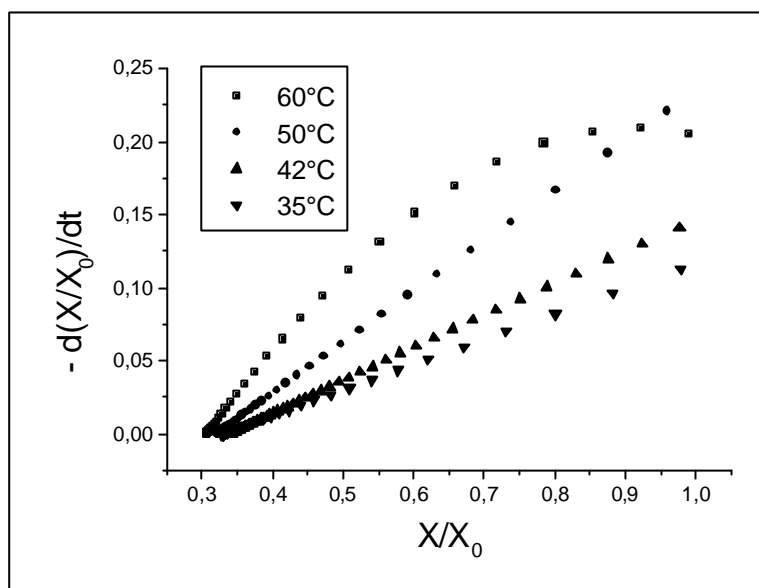


Figura 3 – Variação da velocidade de secagem $-d(X/X_0)/dt$ em função do teor de umidade adimensional X/X_0 .

Observando a Figura 3, pode-se verificar que somente a curva de velocidade de secagem a 60°C apresenta o regime de secagem à taxa constante no início do processo, como se ocorresse a evaporação de uma massa de líquido, sem haver influência direta do sólido na taxa de secagem (Foust *et al.*, 1982). É possível verificar também que a velocidade de secagem aumenta com o aumento da temperatura de ar de secagem.

A diferença de tempo de secagem entre as quatro temperaturas de secagem é bastante apreciável, podendo se refletir em aspectos ligados à economia do processo de secagem. Contudo, por estar se tratando de sementes, estes valores devem ser considerados ao se verificar os valores da conservação da viabilidade germinativa, os quais estão apresentados no Artigo II.

Agradecimentos

À EEI/EPAGRI-SC pelo fornecimento das sementes de pimenta longa, ao CNPq e à FURB pelo fomento da pesquisa.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, N. M. A secagem de semente, Jaboticabal: FUNEP, 1994, 165p.

EMBRAPA/AC Perguntas freqüentes sobre pimeta longa. Disponível em <http://www.embrapa.br/pimentalonga/faqs.htm> Acesso em 07/06/2001.

FOUST, A L.; WENZEL, L. A; CLUMP, C. W.; MAUS, L.; ANDERSEN, L. B. Princípios das operações unitárias, 2ª ed., Rio de Janeiro: John Wiley, 1982.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

PIMENTEL, F.A.; ROCHA, W. B.; CABRAL, W.G. **Colheita, beneficiamento e armazenamento de sementes de pimenta longa (*piper hispidinervium*)**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n.20, out/1999. 2p. (Série Instruções Técnicas).

ROCHA, S.F.R.; MING, L.C. *Piper hispidinervium* C.DC.(Piperaceae) - Uma fonte sustentável de safrol. Disponível em http://www.sne.org.br/congresso/resumos/desenvolvimento_sustentavel/68.htm Acesso em 05/02/2001.

SÁ, C. P.; PIMENTEL, F. A.; CABRAL, W. G.; SILVA, M. R.; PINHEIRO, P. S. N.; BEZERRA, A. L. Coeficientes técnicos e custos para exploração da pimenta longa. Acre: Embrapa/Acre, n. 8, nov./1998, 2p. (série Instruções Técnicas).

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista brasileira de fisiologia vegetal**. v. 12, p.74-84, 2000.

4.2. Estudo de secagem e armazenamento

Artigo II:

**“INFLUÊNCIA DAS TEMPERATURAS DE SECAGEM E DE
ARMAZENAMENTO SOBRE A VIABILIDADE GERMINATIVA DE
SEMENTES DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium*) *IN VITRO*”**

INFLUÊNCIA DAS TEMPERATURAS DE SECAGEM E DE ARMAZENAMENTO SOBRE A VIABILIDADE GERMINATIVA DE SEMENTES DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium*) IN VITRO

Resumo - A pimenta longa é uma planta amazônica que se apresenta como substituta da Canela sassafrás na produção de safrol. Visando o prolongamento da viabilidade germinativa de suas sementes, ensaios de secagem e armazenamento em condições controladas de temperatura foram realizados. Imediatamente após a secagem e aos 50 dias de armazenamento, as sementes foram inoculadas in vitro e avaliadas aos 10, 15 e 20 dias de cultivo em relação ao comportamento germinativo. Os tratamentos aplicados influenciaram o comportamento germinativo das sementes de pimenta longa. As sementes secas em temperatura de 35°C não demonstraram diferenças estatísticas no percentual de germinação quando armazenadas em freezer e em geladeira. Em 320 dias de armazenamento constatou-se que a conservação em geladeira se mostrou mais adequada à conservação de sementes de pimenta longa, sendo a temperatura de secagem de 42°C preferível devido o menor tempo necessário para a secagem até umidade de 14%.

Palavras chave: viabilidade germinativa, Semente, Pimenta longa, secagem

1. INTRODUÇÃO

A pimenta longa (*Piper hispidinervium*) é um arbusto de origem amazônica produtora de óleo essencial com elevadas concentrações de safrol em sua composição (Pinho de Sá *et al.*, 1998). O safrol, ou 4 – alil – 1,2 – metilenodioxibenzeno, é um composto aromático com grande demanda mundial por ser precursor de diversos compostos, entre eles inseticidas biodegradáveis e fixadores de aromas (EMBRAPA/AC, 2001; Pescador *et al.*, 2000).

Esta planta cresce espontaneamente em área de vegetação secundária, de fácil propagação, alta resistência e adaptabilidade a solos de baixa fertilidade (Teribele *et al.*, 2002).

Atualmente a pimenta longa vem sendo estudada como uma alternativa sustentável de produção de safrol na Floresta Amazônica para promover a geração de renda e a redução do êxodo rural da população local (Pinho de Sá *et al.*, 1998, Rocha

& Ming, 1999). Existem, também, pesquisas nas áreas biotecnológicas para verificar a viabilidade da produção de safrol *in vitro* (Valle, *et al.*, 2002).

Sementes são a forma mais comum de conservação *ex situ* (conservação da espécie fora do seu ambiente natural), já que esta é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (Santos, 2000).

O teor de umidade das sementes é, em geral, a principal causa que concorre para a perda do poder germinativo e do vigor (Toledo & Marcos Filho, 1977). Sementes com teores de umidade baixos têm diminuído os efeitos ou o ataque de insetos e dos microrganismos, o que reduz a velocidade de deterioração (Carvalho, 1988). Contudo, o processo de secagem pode se constituir numa das operações que mais influencia a qualidade das sementes (Borém *et al.*, 1996) e por isso deve ser conduzido de forma controlada, sendo que a temperatura do ar não pode exceder a faixa de 70 a 80 °C (Carvalho, 1994).

Segundo Toledo & Marcos Filho (1977), é necessário encontrar um balanço entre a secagem rápida (alta temperatura), que pode resultar no trincamento ou endurecimento e a secagem lenta (baixa temperatura), que pode causar as deteriorações por contaminação microbiana. A temperatura que pode injuriar uma dada semente varia de acordo com o teor de umidade desta: quanto mais elevado o teor de umidade da semente, mais baixa deve ser a temperatura de secagem.

No armazenamento, dentre os principais fatores que afetam a qualidade fisiológica das sementes está a temperatura e o tempo de armazenamento (Mata *et al.*, 1999).

Poucos são os dados sobre a conservação de sementes de pimenta longa, sendo que apenas Pimentel *et al.* (1999) citam que sementes secas ao sol ou à sombra até 14% de umidade podem ter sua vitalidade conservada por 6 meses.

As sementes de pimenta longa apresentam pouca longevidade e decorrentes dificuldades de sua utilização durante o período de entressafra (de março a janeiro), fato esse que vem dificultado os trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa de produção de safrol por via biotecnológica. Sendo assim, o presente trabalho visou estudar a influência que as temperaturas de secagem e armazenamento exercem sobre o tempo de germinação e sobre a viabilidade germinativa de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervium*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SECAGEM E ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES

Espiguetas de pimenta longa (Figura 1) foram coletadas na EEI/EPAGRI-SC nos meses de janeiro a março de 2001, e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (marca Fanem, mod 320-SE) sob temperaturas constantes de 35, 42, 50, 60°C, sendo os tratamentos designados como T35, T42, T50 e T60, respectivamente.



Figura 1 – Espiguetas de pimenta longa maduras *in natura*.

O processo foi interrompido quando as espiguetas atingiram um umidade aproximada de 14 %, para garantir a manutenção da viabilidade germinativa das sementes [8]. A massa final das amostras correspondente a 14% de umidade, foi previamente conhecida por meio da equação 1, citada por Gentil *et al* (2001) O controle da temperatura foi verificado com auxílio de multímetro e termopares.

$$M_f = M_i \frac{(100 - U_i)}{(100 - U_f)} \quad (1)$$

onde:

M_f = massa final da amostra após a secagem [g];

M_i = massa da amostra antes da secagem [g];

U_i = grau de umidade antes da secagem [%];

U_f = grau de umidade desejado após a secagem [%].

Após o processo de secagem, as espiguetas foram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento, colocadas em frascos de vidro de cor âmbar e armazenadas em temperatura ambiente (20 – 25°C), em geladeira (8 – 12°C) e em freezer (em torno de -18°C).

Foram realizadas determinações da viabilidade germinativa das sementes após a secagem e aos 50, 100, 150, 170, 220, 270 e 320 dias de armazenamento, por meio de contagens do número de sementes germinadas *in vitro*.

2.2. BENEFICIAMENTO DAS SEMENTES

Cinco segmentos de espiguetas armazenados nas diferentes condições de temperatura foram reidratados em água deionizada por um período de 24 horas. Em seguida, fez-se a maceração manual das espiguetas para a remoção da mucilagem que recobre as sementes. Finalmente, por meio de lavagens sucessivas obteve-se sementes isentas de qualquer sujidade.

Estas sementes, então, foram submetidas à indução em imersão em água deionizada à 45°C durante 15 minutos.

Após indução, as sementes tiveram sua superfície desinfestada através da imersão em álcool 70% durante 1,5 minuto, seguida da imersão em água sanitária comercial (Qboa) diluída a concentração de 40 %, durante 10 minutos. Todo o processo se deu sob agitação de 120 rpm em agitador orbital. Após a agitação, as sementes foram enxaguadas por 4 vezes com água deionizada e esterilizada em autoclave (121°C/20minutos).

2.3. GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Concluída a desinfestação, as sementes foram inoculadas em placa de Petri contendo meio Murashige & Skoog (1962) adicionado de 7 g/L de ágar (Merk) e 30 g/L de sacarose (Difco). Cada placa foi inoculada de forma asséptica com 30 – 40 sementes, e disposta em estante de crescimento sob condições controladas: iluminação de 3600 Lux, fotoperíodo de 16 horas luz/dia e temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Os ensaios foram realizados utilizando 6 placas de Petri para cada condição temperatura de secagem e armazenamento das sementes.

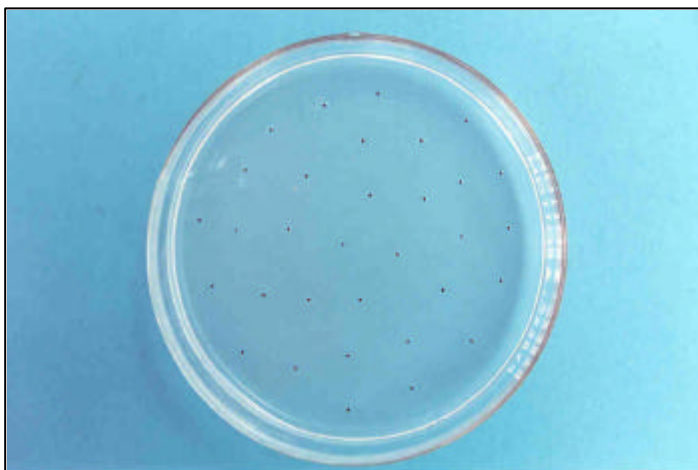


Figura 2 - Placa de Petri contendo meio MS e sementes de pimenta longa.

Foram realizadas contagens do número de sementes germinadas após 10, 15 e 20 dias da inoculação. Foi considerado como germinadas, as sementes que demonstraram a saída da radícula através do tegumento (Carvalho, 1988).

As análises estatísticas dos resultados obtidos no presente trabalho foram baseadas em Análise de Variância (ANOVA) e teste de Separação de Médias (Tukey a 5%).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PIMENTA LONGA

Foi verificada uma diferença significativa entre os tempos de secagem realizadas nas temperaturas de 35, 42, 50 e 60°C necessários para que as espiguetas de pimenta longa atingissem a umidade de 14% [8]. Esses tempos estão demonstrados na Tabela 1.

A manutenção da viabilidade germinativa de sementes é dependente da agressividade que a temperatura de secagem oferece ao embrião e também à percentagem de água final que deve conter as sementes após estas terem sido secas. Além disto, as injúrias causadas pela temperatura varia de acordo com o tempo de exposição da semente (Carvalho, 1983).

A diferença de tempo de secagem entre as quatro temperaturas é bastante apreciável, podendo se refletir em aspectos ligados à economia do processo de

secagem. Contudo, por estar se tratando de sementes, estes valores devem ser considerados ao se verificar os percentuais de sementes viáveis.

Tabela 1 – Relação entre tempo de secagem e percentagem de água de sementes de pimenta longa para as temperaturas de secagem de 35, 42, 50 e 60°C.

Tratamento	Temperatura (°C)	Tempo (hora)	Conteúdo de água (%)
T35	35	50,13	14,86
T42	42	22,17	14,61
T50	50	13,17	14,60
T60	60	6,00	14,76

A germinação das sementes de pimenta longa determinada *in vitro* mostrou ser uma metodologia eficaz, dada à facilidade de visualização das microplantas em desenvolvimento e às baixas taxas de contaminação observadas.

Na Figura 3, onde está demonstrado o efeito da temperatura de secagem sobre a germinação das sementes, pode-se observar que não existe diferença estatística entre os ensaios realizados a 35 e 60°C e entre 42 e 50°C. Tal fato pode estar indicando que a temperatura de secagem não é o fator preponderante para a manutenção da viabilidade germinativa das sementes inoculadas imediatamente após a secagem. Borém *et al.* (1996) também observaram que os tratamentos de secagem não tiveram efeito imediato sobre a germinação de sementes de milho.

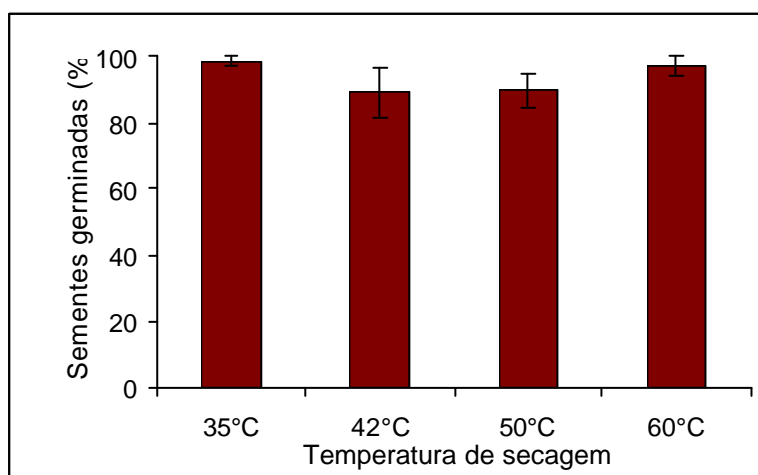


Figura 3 - Percentagem de sementes geminadas após secagem em temperaturas de 35, 42, 50 e 60°C (sementes sem armazenamento).

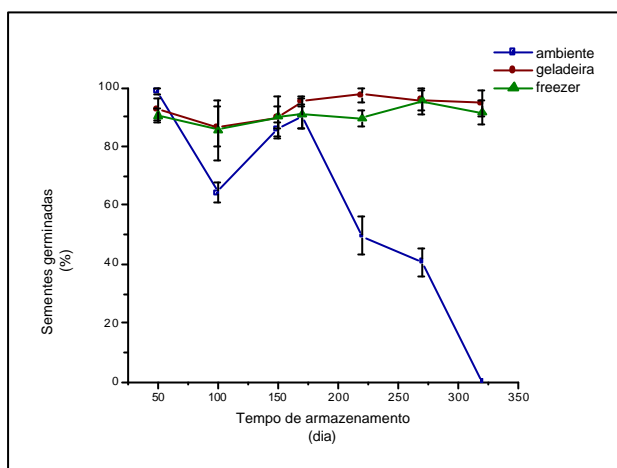
O comportamento germinativo das sementes de pimenta longa submetidas aos tratamentos T35, T42, T50 e T60 durante o armazenamento no ambiente, em geladeira e em freezer está apresentado na Figura 4.

Ao se comparar as taxas de germinação de sementes com e sem armazenamento (Figuras 3 e 4), pode-se observar que o número de sementes germinadas foi superior quando estas foram inoculadas imediatamente após terem sido submetidas ao processo de secagem, ou seja, sem terem sido armazenadas. Com o aumento do tempo de armazenamento há um declínio da viabilidade germinativa das sementes para os quatro tratamentos de secagem.

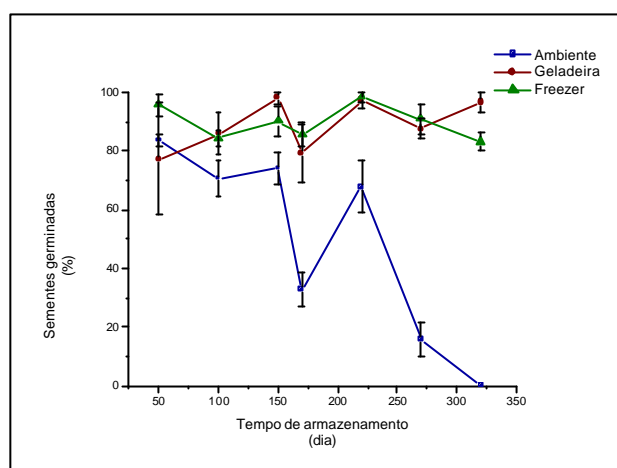
Observando a Figura 4 vê-se que as sementes armazenadas em temperatura ambiente evidenciam um maior declínio da germinação total (após 20 dias de inoculação) em comparação aos armazenamentos realizados em geladeira e em freezer. O armazenamento em temperatura ambiente inviabilizou a germinação de sementes dos quatro tratamentos de secagem, entretanto, os ensaios T35 e T42, embora apresentando taxas decrescentes de germinação, tiveram a perda do poder germinativo mais retardado e, comparativamente, menos intensa nas sementes secas a 35°C. Segundo Mata & Menegalli (1998), temperaturas de até 45°C não afetam a qualidade fisiológica das sementes.

O percentual de germinação observados nos tratamentos T50 e T60 armazenados à temperatura ambiente foi mais acentuado, sendo que aos 220 e 150 dias, respectivamente, a germinação já se demonstrava inexpressiva. As temperaturas de secagem mais elevadas podem ter causado trincamentos no tegumento, facilitando o ataque de microrganismos e inviabilizando os embriões. O trincamento ocorre devido à diferença de velocidade de encolhimento das partes externas e internas das sementes (Carvalho, 1988). A injúria causada pela temperatura varia de acordo com o tempo de exposição e com o teor de umidade das sementes (Carvalho, 1988).

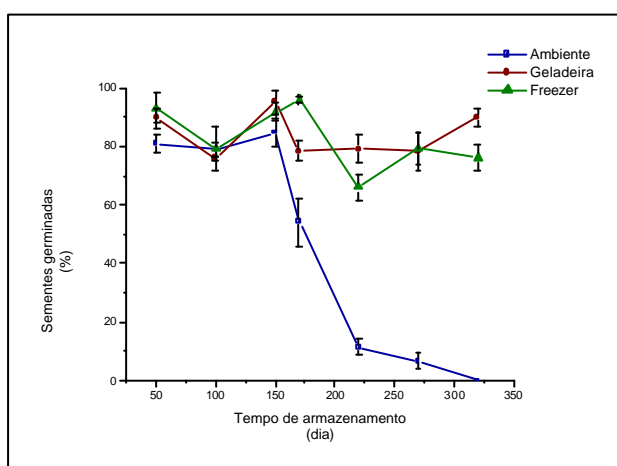
Observando os gráficos da Figura 4 vê-se que existem leituras que fogem à tendência do comportamento da curva de perda de viabilidade com o tempo, isto certamente está ocorrendo por se tratar de um produto biológico e por ser extremamente sensível à ação de muitos fatores (Mata & Menegalli, 1998), que não foram considerados neste trabalho.



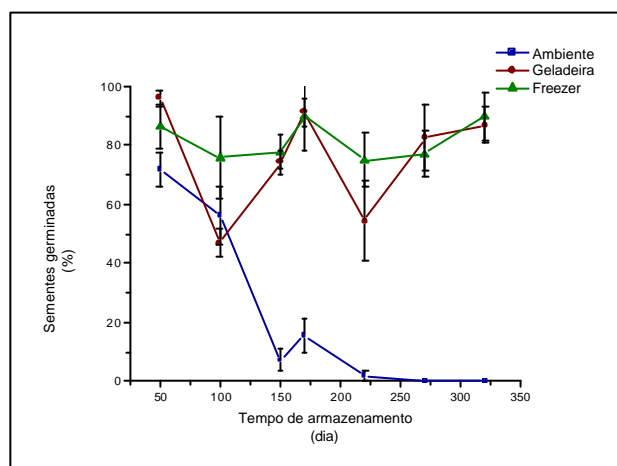
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4 – Variação da taxa de germinação de sementes armazenadas em temperatura ambiente, geladeira e freezer nas diferentes condições de secagem: (a) sementes submetidas à secagem a 35°C, (b) sementes submetidas à secagem a 42°C, (c) sementes submetidas à secagem a 50°C e (d) sementes submetidas à secagem a 60°C.

O armazenamento de sementes sob refrigeração e em freezer proporcionou comportamentos semelhantes nas taxas de germinação das sementes em todas as condições de secagem propostas. Gentil *et al.* (2001) também verificaram que o armazenamento de sementes em temperaturas mais baixas favorece o

prolongamento da vitalidade das sementes de café. Todavia, sementes do tratamento T60 armazenadas em geladeira apresentaram um comportamento mais instável, sendo possível verificar uma variabilidade nos resultados demonstrados nas repetições, o que leva à obtenção de grandes desvios padrão. Este fato pode estar relacionado com o maior grau de agressividade que a temperatura de secagem de 60°C proporcionou às sementes, associada também à temperatura de armazenamento, entre 7 – 10°C (temperatura da geladeira), tendo sido possivelmente incapaz de reduzir a taxa do metabolismo do embrião viável. Mata & Menegalli (1998) citam que existe uma interação entre a temperatura de secagem e a umidade final da semente, sendo que sementes de feijão demonstraram que quando a secagem foi realizada em temperatura mais baixa a umidade das sementes poderia atingir também valores mais baixos sem influenciar significativamente no vigor das sementes. Desta forma, nas temperaturas de 50 e 60° C, é possível que a umidade final de 14% tenha sido muito baixa para a manutenção da viabilidade germinativa das sementes de pimenta longa.

A Tabela 2 apresenta os valores médios dos índices de germinação de sementes de pimenta longa nos diferentes tempos de conservação. Por meio desta tabela, pode-se verificar que aos 320 dias de conservação, não houve diferença estatística entre as sementes armazenadas sob refrigeração, quanto ao percentual de germinação. O armazenamento em freezer demonstrou ser prejudicial à manutenção da viabilidade das sementes, principalmente àquelas submetidas a 42 e 50°C. Por meio destes resultados pode-se dizer que sementes com umidade 14% devem ser armazenadas em temperaturas de refrigeração, independentemente da temperatura de secagem.

As sementes armazenadas no ambiente não germinaram aos 320 dias de conservação, independentemente da temperatura em que foram secas. À temperatura ambiente, a semente é mais susceptível ao ataque de microrganismos e a taxa metabólica também é maior. Provavelmente esses fatores foram os responsáveis pela inviabilização as sementes mantidas em temperatura ambiente. Hung *et al.* (2001) verificaram que a conservação de sementes de tomate em temperatura acima de 20°C apresentaram redução significativa no poder germinativo, sendo que a menor temperatura testada, 10°C manteve 80%, aproximadamente, das sementes viáveis durante 200 dias.

Tabela 2 – Valores médios de índices de germinação total* (%) de sementes de pimenta longa armazenadas em diferentes condições de temperatura.

Tratamentos		Períodos de armazenamento						
Temperatura de secagem	Local de armazenagem	(dia)						
		50	100	150	170	220	270	320
°C		%						
35	ambiente	98,6a	64,3 ^{de}	85,9bc	90,2abc	49,5f	40,8c	0,00d
	geladeira	92,8ab	86,7ab	89,9ab	95,5a	97,6a	95,7a	94,68a
	freezer	90,6abc	93,4 ^a	90,1ab	91,0ab	89,5ab	95,6a	91,44ab
42	ambiente	83,6cd	70,7cd	75,6d	32,9e	65,6de	15,7cd	0,00d
	geladeira	84,1bcd	82,5abc	98,0a	83,4bc	97,3a	87,6ab	96,56a
	freezer	95,7a	84,4ab	90,1ab	85,8abc	98,7a	90,9ab	83,3bc
50	ambiente	81,1d	79,1bc	84,7bc	54,1d	11,2g	6,7d	0,00d
	geladeira	89,8abcd	75,8bcd	95,2a	78,6c	79,3bc	78,5ab	90,06ab
	freezer	93,0ab	79,4bc	91,9ab	95,9a	66,0de	79,2ab	76,16c
60	ambiente	71,7e	56,2ef	7,2e	15,5f	01,9g	00,0d	0,00d
	geladeira	95,9a	47,0f	73,3d	91,3ab	54,4ef	69,0b	86,9ab
	freezer	86,5bcd	70,3cd	77,8cd	89,7abc	75,0cd	77,1ab	89,78ab

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observando-se a Tabela 2, verifica-se, também, que apesar dos armazenamentos de sementes em geladeira e freezer terem apresentado tendência de superioridade em relação ao armazenamento à temperatura ambiente para a maioria dos períodos de armazenamento, na avaliação feita nos 320 dias de conservação, as taxas médias de germinação superiores a 76%.

A temperatura de secagem de 60°C demonstrou as maiores diferenças estatísticas entre as três formas de conservação de sementes, em ambiente, em geladeira e em freezer, bem como as maiores perdas da viabilidade germinativa. Este fato pode estar relacionado as maiores alterações causadas pela temperatura sobre membranas, desnaturação de moléculas de proteínas e alterações em moléculas de lipídios e carboidratos ou por ter afetado as propriedades da água presente no interior

das sementes de pimenta longa como sugere Connor & Bonner (2001) em trabalhos realizados com *Acer saccharium* e *aesculus pavia*. Segundo Mato & Menegalli (1998) a perda da qualidade fisiológica das sementes são devido as temperaturas elevadas, umidade relativa baixa, secagem com teor de umidade elevado, ou ainda uma associação destes fatores.

A conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Ocotea corymbosa* mostrou ser mais eficiente em câmara fria que o armazenamento no ambiente do laboratório (Maluf *et al.*, 2000).

Apesar de importante no conjunto dos tratamentos, o teste de germinação não conseguiu isolar, com precisão, a associação mais adequada entre a temperatura de secagem e de armazenamento para a conservação de sementes. Essa baixa sensibilidade talvez possa ser superada com a ampliação do período experimental e através da análise de características fenotípicas. Contudo, os dados obtidos evidenciaram que, independentemente da temperatura de secagem, a redução da temperatura de armazenamento tendeu a elevar o período de conservação das sementes.

Os resultados demonstraram que, apesar da baixa longevidade das sementes de pimenta longa, é possível aumentar o período de conservação das mesmas por meio da combinação de tratamentos (temperatura de secagem x temperatura de armazenamento).

3.2. TEMPO DE GERMINAÇÃO

Foi realizada a avaliação do tempo de germinação de sementes de pimenta longa, por meio da contagem de sementes em tempos de 10, 15 e 20 dias após a inoculação das sementes em placas de Petri contendo meio MS sob condições controladas de temperatura, luminosidade e fotoperíodo, conforme descrito no item Material e Métodos.

A observância do tempo de germinação de sementes de pimenta longa se torna importante quando se estabelece o intervalo entre a inoculação das sementes e a inoculação dos explantes para a produção de massa celular, sendo que para os ensaios propostos neste trabalho, o tempo foi especificado em 60 dias para a coleta de explantes e foi observado que esse tempo deve ser prolongado a medida em que aumenta o tempo de armazenamento das sementes.

Os resultados em termos de percentuais de sementes germinadas nos diferentes tratamentos e tempos de armazenamentos e a análise estatística desses resultados estão apresentados na Tabela 3.

Na Tabela 3 pode-se verificar que a diferença entre as taxas de germinação de sementes armazenadas em temperatura ambiente e as sementes armazenadas na geladeira e no freezer aumenta com o tempo de armazenamento, sendo que essa diferença torna-se significativa a partir de 220 dias para sementes secas a 35°C, 170 dias para sementes secas a 42 e 50°C e 150 dias para as sementes secas a 60°C. Assim, pode-se concluir que quanto maior a temperatura de secagem, menor a resistência das sementes armazenadas em temperatura ambiente, no que diz respeito à manutenção da viabilidade do embrião. Este fato pode estar relacionado à ação enzimática natural da semente, ataque a agentes contaminantes e oxidação de moléculas.

Em relação ao tempo de germinação, constata-se que os índices de germinação nos primeiro 10 dias após a inoculação são elevados, com valores acima de 80% do total de sementes germinadas, para a grande maioria dos tratamentos, o que significa que o processo de germinação da semente de pimenta longa é rápido. Contudo pode-se constatar na Tabela 3 uma germinação mais tardia das sementes armazenadas em temperatura ambiente e este fato é agravado quando utiliza-se temperaturas mais elevadas no processo de secagem (50 e 60°C) e com o aumento do tempo de armazenamento.

A Tabela 3 também apresenta o congelamento em freezer como a melhor forma de conservação de sementes de pimenta longa, com melhores índices médios de germinação, mas, em todos os tratamentos, as diferenças entre as percentagens de sementes germinadas armazenadas em freezer e em geladeira, não diferem estatisticamente até 270 dias de armazenamento. A confirmação da melhor forma de conservação das sementes de pimenta longa com umidade de 14% pode se dar com a ampliação dos ensaios de germinação e através da avaliação das condições fisiológicas das microplantas advindas de sementes secas e armazenadas.

Tabela 3 – Valores percentuais médios de sementes germinadas 10, 15 e 20 dias após a inoculação nos diferentes tempos de armazenamento e tratamentos de secagem e condição de armazenamento (A=ambiente, G=geladeira, F=freezer)*.

Tempo de armazenamento (dia)	Condição de armazenamento	Temperatura de secagem (°C)											
		35			42			50			60		
		Tempo de germinação (dia)											
		10	15	20	10	15	20	10	15	20	10	15	20
		%			%			%			%		
50	A	95,9 a	97,8 a	98,6 a	63,9 f	82,1 abcd	83,6 abcde	64,4 abc	74,9 cde	81,1 cd	50,6 bcde	67,1 bc	71,7 cd
	G	83,9 abcd	92,8 a	92,8 a	69,7 def	85,4 abcd	77,2 cdef	86,0 a	88,4 abc	89,8 abc	85,9 a	95,5 a	95,9 a
	F	71,4 bcd	90,1 a	90,6 a	84,1 abcde	95,2 abc	95,7 ab	86,4 a	91,6 ab	93,0 ab	56,2 abcd	82,8 ab	86,5 abc
100	A	29,7 e	60,8 b	64,3 b	67,3 ef	72,1 de	70,7 ef	66,2 abc	77,5 cde	79,0 d	00,8 g	14,5 d	56,2 de
	G	62,3 d	85,8 a	86,7 a	76,9 cdef	80,9 bcd	85,8 abcde	46,2 cd	65,2 ef	75,9 de	01,7 g	15,2 d	47,0 e
	F	69,0 cd	82,4 a	85,5 a	78,1 bcdef	80,9 bcd	84,4 abcde	41,2 cd	77,0 cde	79,4 d	38,7 cdef	65,4 bc	75,8 bc
150	A	84,7 abcd	85,9 a	85,8 a	68,9 ef	72,9 de	74,1 def	73,4 ab	80,7 bcd	84,7 bcd	01,4 g	05,0 d	7,2 f
	G	84,5 abcd	88,7 a	89,8 a	97,9 a	97,9 a	97,9 ab	87,4 a	93,3 ab	95,2 a	69,1 abc	74,43 abc	74,3 bc
	F	81,1 abcd	87,7 a	90,1 a	81,5 abcdef	88,3 abcd	90,1 abc	72,4 ab	88,4 abc	91,9 ab	72,3 ab	76,4 abc	77,7 bc
170	A	84,6 abcd	87,6 a	90,2 a	31,9 g	32,9 f	32,9 g	01,3 e	41,6 g	54,1 f	00,0 g	09,9 d	15,5 f
	G	89,5 abc	92,2 a	95,5 a	74,2 cdef	78,1 cd	79,4 cdef	32,4 d	71,4 def	78,6 d	45,1 bcdef	85,4 ab	91,3 ab
	F	85,1 abcd	89,3 a	90,9 a	79,0 bcdef	84,4 abcd	85,8 abcde	75,2 ab	95,5 a	95,9 a	15,8 fg	69,4 bc	89,7 abc
220	A	12,1 e	46,8 bc	49,5 c	10,0 h	57,2 e	67,8 f	00,0 e	8,40 h	11,2 g	00,0 g	01,3 d	01,9 f
	G	96,3 a	97,6 a	97,6 a	88,6 abcd	95,9 ab	97,3 ab	60,4 bc	76,7 cde	79,3 d	32,0 defg	53,0 c	54,4 de
	F	80,4 abcd	87,0 a	89,5 a	96,1 ab	98,7 a	98,7 a	40,9 cd	651,0 f	66,0 e	27,1 defg	62,0 bc	75,0 bc
270	A	16,0 e	33,1 c	40,8 c	10,2 h	15,7 g	15,7 h	00,0 e	SC**	06,7 g	00,0 g	SC**	00,0 f
	G	93,8 ab	95,1 a	95,7 a	84,0 abcde	84,7 abcd	87,6 abcd	56,7 bcd	SC	78,5 d	20,9 efg	SC	82,4 abc
	F	93,5 ad	94,3 a	95,6 a	83,7 abcde	89,6 abc	90,8 abc	41,0 cd	SC	79,2 d	31,1 defg	SC	77,1 bc
320	A	0,00 f	0,00 e	00,0 d	00,0 i	0,00 h	0,00 i	0,00 e	0,00 h	0,00 h	0,00 g	0,00 d	0,001 f
	F	88,8 abc	93,5 a	94,7 a	93,1 abc	94,8 abc	96,6 ab	73,2 ab	86,8 abc	90,1 abc	39,6 bcdef	77,6 abc	86,9 abc
	G	85,5 abcd	91,6 a	91,4 a	67,2 ef	79,7 bcd	83,3 bcde	55,0 bcd	72,8 def	76,2 de	25,6 defg	80,5 ab	89,8 abc

(*) médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(**) Sem contagem

A análise estatística revela que as sementes do tratamento T35, germinadas durante 20 dias depois de inoculadas, não apresentam diferenças estatísticas no percentual germinado quando armazenada em freezer e em geladeira, para todos os tempos amostrados. Esse resultado sugere que a temperatura de 35°C, mesmo necessitando de um tempo prolongado para que a secagem atinja a umidade de 14%, não acarreta danos às sementes. Nessa mesma temperatura, os índices de germinação foram superiores em relação aos ensaios realizados com as demais temperaturas de secagem.

Na Tabela 4, estão apresentadas as análises estatísticas referentes ao percentual de sementes germinadas após 320 dias de armazenamento em geladeira e em freezer. Por meio destes resultados verifica-se que não existem diferenças significativas entre as sementes armazenadas em geladeira nos três tratamentos de secagem durante os 320 dias em que as sementes foram avaliadas. O mesmo ocorre com o armazenamento em freezer, a exceção do tratamento T50, o qual demonstrou diferenças estatísticas dos demais tratamentos, tanto em geladeira como em freezer. Para que a seleção da melhor forma de conservação (secagem x armazenamento) devem ser realizadas avaliações do percentual de sementes por um período mais prolongado. Todavia, pode-se afirmar que o armazenamento em geladeira demonstrou ser mais adequado, ao se comparar os valores das médias percentuais de sementes de pimenta longa germinadas.

Tendo em vista a igualdade estatística entre os tratamentos T35 e T42 armazenados em geladeira, a temperatura de secagem de 42°C é preferida devido ao menor tempo necessário para o processo de secagem de espiguetas até umidade de 14%. O menor tempo pode se refletir em um menor custo energético.

Tabela 4 – Percentagem de sementes germinadas após 320 dias de armazenamento em freezer e em geladeira.

Armazenamento	Temperatura de secagem (°C)			
	35	42	50	60
Geladeira	94,68 a	96,56 a	90,06 ab	86,9 ab
Freezer	91,40 ab	83,30 bc	76,16 c	89,78 ab

(*) médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. CONCLUSÕES

- ◆ A temperatura de secagem não exerceu influência relevante no percentual de sementes germinadas quando estas não foram submetidas ao armazenamento.
- ◆ Há perdas no poder germinativo das sementes de pimenta longa com o período de armazenamento, sobretudo em condições não controladas (temperatura ambiente), o que sugere a necessidade de cuidados especiais no que se refere à correta conservação de sementes.
- ◆ A temperatura de armazenamento juntamente com a temperatura de secagem influenciou o tempo de germinação das sementes.
- ◆ Os fatores temperatura de conservação e temperatura de secagem devem ser considerados juntos quando da decisão de um processo de conservação de sementes.
- ◆ A melhor forma de estocagem de sementes deve ser conhecida para preservar a semente sob as melhores condições possíveis e minimizando custos de conservação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORÉM, F. M.; HARA, T.; SILVA, R. F.; ARAÚJO, E. F. Efeito da secagem e do armazenamento na germinação e no vigor de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 21, n. 1,2, p. 33-39, 1996.

CARVALHO, N. **Sementes : ciência, tecnologia e produção**.. 3ª. ed Campinas: Fundação Cargill, 1988. 429 p.

CARVALHO, N. M. A secagem de semente, Jaboticabal: FUNEP, 1994, 165p.

CHAVES, J. L. Pimenta longa reativa o safrol. **Química e derivados**, v. 2, p. 40-46, 1994.

Embrapa/AC – Pimenta longa. **Centro de Informação de Pimenta longa**. Disponível em <http://www.embrapa.br/pimentalonga/faqs.htm>. Acesso em: 07/06/2001.

GENTIL, D. F. O.; SILVA, W. R.; MIRANDA, D. M. Grau de umidade e temperatura na conservação de sementes de café. **Bragantia**, v. 60, n. 1, p. 53-64, 2001.

HUNG, L. Q.; HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Constant, fluctuating and effective temperature and seed longevity: a tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) exemplar. **Annals of Botany**, v. 88, p. 465-470, 2001.

MALUF, A. M.; PASSOS, R.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Longevidade e germinação dos diásporos de *Ocotea corymbosa* (Meissn.) Mez. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 1, 2000. (versão impressa).

MATA, M. E. R. M. C.; BRAGA, M. E. D.; FIGUERÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Perda da qualidade fisiológica de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) armazenadas sob condições controladas. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 24, n. 1, 1999, p. 10 - 25.

MATA, M. E. R. M. C.; MENEGALLI, F. C. Efeito da secagem a altas temperaturas por curtos períodos de tempo na germinação das sementes de feijão. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 60, n. 1, p. 53-64, 2001.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P.S.; MAAS, C.H.; REBELO, R.A.; GIOTTO, C.R.; WENDHAUSEN JR., R.; LARGURA, G. e TAVARES, L.B.B. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta longa. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p. 18-23, n 15, julho-agosto - 2000.

PIMENTEL, F.A.; ROCHA, W. B.; CABRAL, W.G. **Colheita, beneficiamento e armazenamento de sementes de pimenta longa (*piper hispidinervium*)**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n.20, out/1999. 2p. (Série Instruções Técnicas).

PINHO DE SÁ, C.; PIMENTEL, F.A.; CABRAL, W.G.; SILVA, M.R.; PINHEIRO, P.S.N.; BEZERRA, A.L. **Coeficientes técnicos e custos para exploração da Pimenta longa**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n.8, nov/1998, 2p. (Série Instruções Técnicas).

ROCHA, S.F.R.; MING, L.C. *Piper hispidinervium* C.DC.(Piperaceae) - Uma fonte sustentável de safrol. Disponível em http://www.sne.org.br/congresso/resumos/desenvolvimento_sustentavel/68.htm Acesso em 05/02/2001.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista brasileira de fisiologia vegetal**. v. 12. p.74-84, 2000.

TERIBELE, T.; COSTA, C. M. L.; MAIA, J. G. S.; FARIA, L. J. G. Secagem de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) em secador solar eólico. In: **XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Natal, 2002. (CD-ROM).

TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. **Manual das sementes – Tecnologia da produção**. Ed. Agronômica Ceres: São Paulo, 224p, 1977.

VALLE, R. C. S. C.; OLIVEIRA, A. C.; OCHNER, G.; SCIPMANN, M. A.; DEBIASI, C.; TAVARES, L. B. B.; FURIGO JR. A. Estudo da concentração de reguladores de

crescimento vegetal no meio de cultivo de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) para a produção de calo. In: **Anais VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Maringá, 2002. (no prelo)

4.3. ESTUDO DE DIFERENTES UMIDADES E ARMAZENAMENTO

Artigo III

**“ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA UMIDADE DE SEMENTES DE
PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium*) ARMAZENADAS EM
CONDIÇÕES DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO SOBRE A
VIABILIDADE GERMINATIVA *IN VITRO*”**

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA UMIDADE DE SEMENTES DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium*) ARMAZENADAS EM CONDIÇÕES DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO SOBRE A VIABILIDADE GERMINATIVA *IN VITRO*

Resumo. Os efeitos do teor de umidade e da temperatura de armazenamento sobre a germinação *in vitro* de sementes de *Piper hispidinervium* (pimenta longa) foram estudados. As sementes foram submetidas à secagem em temperatura de 42°C até atingirem umidades médias de 10, 15, 20, 28, 38 e 45%, e em seguida colocadas, em ausência de luz, em refrigerador e em freezer. A determinação da viabilidade germinativa foi realizada “*in vitro*”, utilizando-se, para tanto, sementes assépticas inoculadas em placas de petri contendo meio MS. O processo germinativo ocorreu em sala de crescimento sob condições controladas de iluminação, fotoperíodo e temperatura. A contagem do número de sementes germinadas se deu a 10, 15, 20, 26, 31 e 44 semanas de armazenamento. As sementes armazenadas em temperatura de 8 ± 2 °C (geladeira) com baixo teor de umidade, 10, 15 e 20 %, não apresentaram diferenças na manutenção da viabilidade.

Palavras chave: viabilidade germinativa, Semente, Pimenta longa, teor de umidade.

1. INTRODUÇÃO

A pimenta longa (*Piper hispidinervium*) vem despertando grande interesse por parte de produtores, empresas nacionais e internacionais, processadoras de óleos essenciais ricos em safrol e está sendo cultivada na Região Amazônica. O safrol deixou de ser largamente produzido no Brasil após a extinção da canela sassafrás, sendo atualmente importado, principalmente da China e Vietnã (Pinho de Sá *et al.*, 1998; Costa, 2000).

O safrol é um composto aromático largamente utilizado pela indústria na composição de fármacos, inseticida biodegradável e cosméticos, estando presente em teores acima de 90% no óleo essencial extraído de folhas e talos finos de pimenta longa (Pescador *et al.*, 2002).

Sementes têm como papel biológico a conservação e a disseminação da espécie. O período de tempo em que as sementes podem manter-se viáveis, é extremamente variável e depende das características genéticas da espécie (as quais definem o período de vida designado como longevidade) e dos efeitos do meio ambiente durante a formação, desenvolvimento, maturação, colheita, processamento e armazenamento da semente (Carvalho, 1988).

As sementes de pimenta longa apresentam uma baixa longevidade, podendo ser armazenada em geladeira por 5 meses após secagem à sombra até umidade em torno de 14%. Sementes com umidades elevadas ou submetidas à secagem excessiva perdem seu poder germinativo em curto espaço de tempo (Pimentel *et al.*, 1999).

Processos de secagem em condições controladas são realizados com sementes visando estabelecer condições ideais mínimas necessárias para o seu armazenamento, pois elevada umidade associada à condição ambiente podem levar à deterioração das sementes (Olsen & Cremasco, 1999).

Estudos realizados por Valle *et al.*, demonstrados no artigo II, indicam que temperaturas de secagem de 42° C promovem boa conservação de sementes de pimenta longa com umidade em torno de 14%. A temperatura de conservação também é importante para a manutenção da viabilidade germinativa de sementes.

O teor de umidade da semente afeta diversos processos biológicos como o consumo de reservas, a germinação, favorece o ataque de fungos e insetos quando o valor é elevado. A respiração da semente é muito influenciada pelo seu conteúdo de água (Carvalho, 1988). Vertucci *et al.* (1994) citam que o conteúdo adequado de água na semente varia conforme a espécie.

Todavia, a temperatura de armazenamento também é de grande importância, pois as atividades metabólicas podem ser mantidas em níveis baixos desde que as sementes permaneçam sob baixas temperaturas (Toledo & Marcos Filho, 1977). A temperatura, por exercer influência sobre todos os processos biológicos da semente, é considerada um dos principais fatores extrínsecos que mais compromete a qualidade da semente durante o armazenamento (Bosco *et al.*, 1980).

Segundo Harrington (1972), citado por Almeida *et al.* (2003), para a correta preservação da viabilidade das sementes faz-se necessário reduzir a umidade e a temperatura de confinamento a níveis adequados, mantendo-os pelo período de armazenamento.

Hung *et al.* (2001) afirmam que a deterioração das sementes durante a estocagem ocorre como um resultado de uma combinação de três principais fatores: período de armazenamento, temperatura e conteúdo de água. Segundo Borém *et al.* (1996) a temperatura e o teor de umidade das sementes são considerados parâmetros intimamente associados à redução da qualidade das sementes.

A partir destas considerações, este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar as influências do grau de umidade e da temperatura de armazenamento na manutenção da viabilidade de sementes de pimenta longa submetidas ao processo de secagem a 42°C.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. SECAGEM E ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES

Espiguetas de pimenta longa (Figura 1) foram coletadas na EEI/EPAGRI-SC nos meses de janeiro a março de 2001, e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (marca Fanem, mod 320-SE) sob temperatura constante de 42°C, controlada com auxílio de multímetros e termopares. O processo foi interrompido à medida que a massa das espiguetas atingiam o valor correspondente à massa de espiguetas com umidade de 10, 15, 20, 28, 38 e 45% (conforme a equação 1), sendo os tratamentos designados como T10, T15, T20, T28, T38 e T45, respectivamente.



Figura 1 – Espiguetas de pimenta longa maduras *in natura*.

A massa final das amostras correspondente as umidades desejadas foi previamente conhecida por meio da equação 1, citada por Gentil *et al* (2001). Para este cálculo se fez necessário determinar a massa seca de uma amostra de sementes, a qual foi realizada utilizando-se a metodologia proposta pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

$$M_f = M_i \frac{(100 - U_i)}{(100 - U_f)} \quad (1)$$

onde:

M_f = massa final da amostra após a secagem [g];

M_i = massa da amostra antes da secagem [g];

U_i = grau de umidade antes da secagem [%];

U_f = grau de umidade desejado após a secagem [%].

Após o processo de secagem, as espiguetas foram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento, colocadas em frascos de vidro de cor âmbar e armazenadas durante 320 dias em temperatura ambiente (20 – 25°C), em geladeira (8 – 12°C) e em freezer (em torno de -18°C).

Foram realizadas determinações da viabilidade germinativa das sementes após a secagem e depois de 10, 15, 20, 26, 31, e 44 semanas de armazenamento, por meio de contagens do número de sementes germinadas *in vitro*.

Espiguetas *in natura* foram inoculadas após a colheita e também foram armazenadas nas mesmas condições que as sementes submetidas ao processo de secagem. As espiguetas *in natura* apresentaram uma umidade média de 72%.

2.2. BENEFICIAMENTO DAS SEMENTES

Cinco segmentos de espiguetas armazenados nas diferentes condições de temperatura foram reidratados em água deionizada por um período de 24 horas. Em seguida, fez-se a maceração manual das espiguetas para a remoção da mucilagem que recobre as sementes. Finalmente, por meio de lavagens sucessivas obteve-se sementes isentas de qualquer sujidade.

As sementes tiveram sua superfície desinfetada por meio de imersão em álcool 70% durante 1,5 minuto, seguida da imersão em água sanitária comercial

(Qboa) diluída a concentração de 40 %, durante 10 minutos. Todo o processo se deu sob agitação de 120 rpm em “shaker” orbital. Após a agitação, as sementes foram enxaguadas por 4 vezes com água deionizada e esterilizada em autoclave (121°C/20minutos).

2.3. GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Concluída a desinfecção, as sementes foram inoculadas em placa de Petri (Figura 2) contendo meio Murashige & Skoog (1968) adicionado de 7 g/L de ágar (Merk) e 30 g/L de sacarose (Difco). Cada placa foi inoculada de forma asséptica com 30 – 40 sementes, e disposta em estante de crescimento sob condições controladas: iluminação de 3600 Lux, fotoperíodo de 16 horas luz/dia e temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Os ensaios foram realizados utilizando 6 placas de Petri para cada condição temperatura de secagem e armazenamento das sementes. Em cada placa foram inoculadas de 30 – 45 sementes.

Foram realizadas contagens do número de sementes germinadas após 10 e 20 dias da inoculação. Foi considerado como germinadas, as sementes que demonstraram a saída da radícula através do tegumento (Carvalho, 1988).

As análises estatísticas dos resultados obtidos no presente trabalho foram baseadas em Análise de Variância (ANOVA) e teste de Separação de Médias (Tukey a 5%).

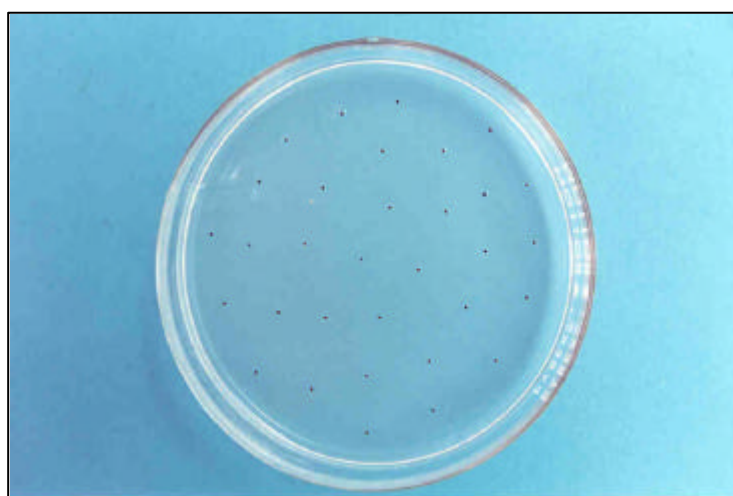


Figura 2 - Placa de Petri contendo meio MS e sementes de pimenta longa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O percentual de sementes de pimenta longa viáveis mostrou ser influenciado tanto pelo teor de umidade como pela temperatura de armazenamento.

As sementes provenientes das espiguetas *in natura* apresentaram uma umidade inicial de aproximadamente 72%, com percentual de germinação em torno de 98%. Este percentual de umidade favoreceu o crescimento de fungos inviabilizando as sementes armazenadas à 8 ± 2 °C (em geladeira) nas 10 primeiras semanas. As sementes armazenadas em freezer apresentaram um decréscimo de 92% e 100% em 10 e 15 semanas de armazenamento, respectivamente. A perda de vitalidade pode estar relacionada com a formação de cristais de gelo no citoplasma das células em virtude do congelamento lento proporcionado pelas condições do freezer e a disponibilidade de água livre, podendo romper tecidos e levar à morte do embrião. Quando o congelamento é rápido, com nitrogênio líquido, sementes de *salix matsudana* se conservam por longo tempo (Maroder *et al.*, 2000).

O comportamento germinativo das sementes de pimenta longa com diferentes umidades, armazenadas em geladeira e em freezer está apresentado nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Observando os gráficos das Figuras 3 e 4 vê-se que existem leituras que fogem à tendência do comportamento da curva de percentual de sementes germinadas com o tempo, isto certamente ocorre por se tratar de um produto biológico e por ser extremamente sensível à ação de muitos fatores (Mata & Menegalli, 1998), que não foram considerados neste trabalho.

As sementes armazenadas na geladeira (Fig 3) com baixo teor de umidade, 10, 15 e 20 %, não apresentaram diferenças na manutenção da viabilidade. Além disto, estes valores de umidade das sementes não demonstraram variações e mantiveram o percentual médio de germinação acima de 94% após 44 semanas de armazenamento.

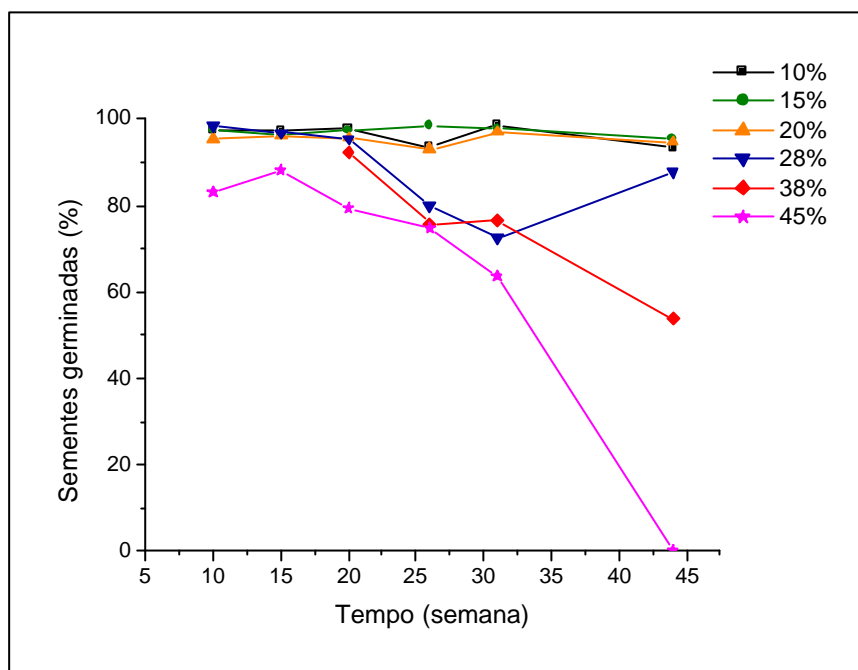


Figura 3 - Perfil do percentual de sementes de pimenta longa germinadas com umidades de 10, 15, 20, 28, 38 e 45% armazenadas em geladeira, durante 44 semanas.

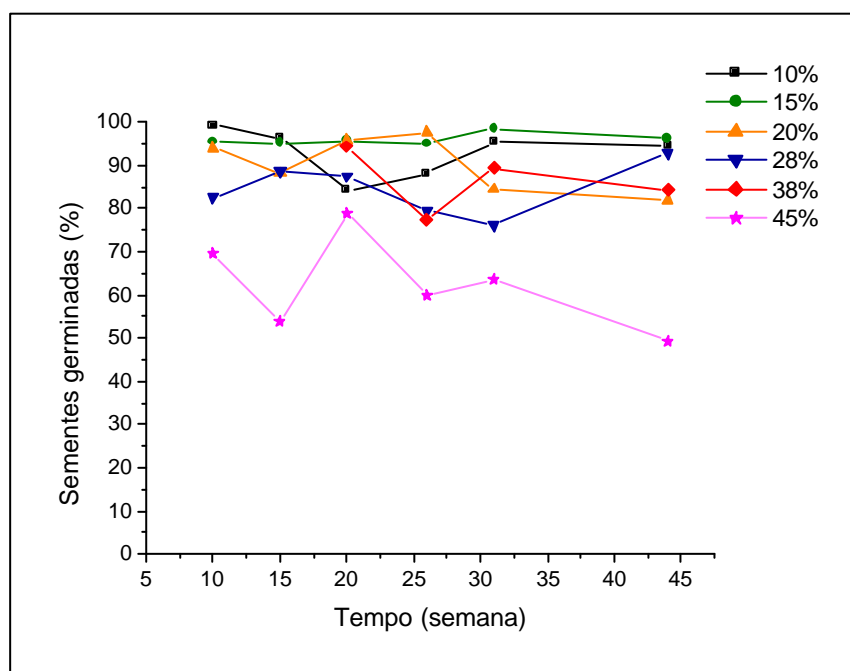


Figura 4 - Perfil do percentual de sementes de pimenta longa germinadas com umidades de 10, 15, 20, 28, 38 e 45% armazenadas em freezer, durante 44 semanas.

É possível observar que as sementes armazenadas em freezer demonstraram um percentual germinativo superior ao apresentado pelas sementes armazenadas em geladeira em todos os tratamentos. Acima de 15% de umidade a viabilidade é decrescente com o aumento do tempo de armazenamento. Todavia, comparando-se as sementes com umidades mais elevadas nas duas formas de armazenamento, observa-se que em geladeira é menos eficiente que o armazenamento em freezer, sendo que as sementes germinadas com umidades de 28, 38 e 45 % às 44 semanas apresentaram 4,5, 30,6 e 49,1 pontos percentuais a mais que em geladeira. Isto sugere que sementes com teores de umidades mais elevados podem ser preservadas em temperaturas mais baixas. Vertucci *et al.* (1994) verificaram que o ótimo conteúdo de água em sementes de pêra aumentou com o decréscimo da temperatura de armazenamento.

Maroder *et al.* (2000) observaram que sementes de *Salix alba* e *Salix matsudana* sobreviveram por semanas quando armazenadas a 5°C e por meses, quando armazenadas a -20°C.

O decaimento inicial da viabilidade germinativa das sementes do tratamento T45 armazenadas em freezer (Figura 4) também pode estar relacionado à formação de cristais de gelo, mas como o conteúdo de água em T45 é menor que em T72, os danos também podem ter sido menores, não levando a inviabilização total do poder germinativo das sementes. A redução da viabilidade em T45 em freezer em 10 e 44 semanas de armazenamento foi de 20 pontos percentuais, encontrando-se 49% das sementes ainda viáveis contra zero das sementes armazenadas em geladeira. Em sementes de pêra as perdas de germinação mais significantes foram demonstradas em sementes com elevados conteúdos de água, acima de 32,5%. (Vertucci *et al.*, 1994).

Em geladeira, as espiguetas com 45% de umidade apresentaram contaminação fúngica visível a partir da amostra retirada às 31 semanas de armazenamento, o que provavelmente causou uma redução significativa seguida da perda total da viabilidade destas sementes. A temperatura de geladeira (~8°C) não impede o crescimento de fungos e a alta umidade ajuda a sua multiplicação Gentil *et al.* (2001). A ocorrência de microrganismos pode representar um evento significativo, principalmente quando são utilizadas embalagens impermeáveis ao vapor d'água e sementes com elevados teor de umidade.

A Tabela 1 apresenta os valores determinados dos percentuais de sementes germinadas em geladeira e em freezer, juntamente com a análise estatística para os tratamentos T10, T15, T20, T28, T38 e T45.

Tabela 1 – Influência do percentual de água contido nas sementes de pimenta longa conservadas em freezer e em geladeira.

Tratamentos		Períodos de armazenamento					
		(semana)					
Umidade da semente	Local	10	15	20	26	31	44
%		%					
10	geladeira	97,4 ^{aA}	97,5 ^{aA}	97,9 ^{aA}	93,5 ^{abAB}	98,7 ^{aA}	93,5 ^{abAB}
	freezer	99,4 ^{aB}	96,8 ^{abAB}	84,2 ^{bcC}	88,1 ^{abcBC}	96,7 ^{aAB}	94,5 ^{aAB}
15	geladeira	96,6 ^{aA}	96,1 ^{abA}	97,4 ^{aA}	98,5 ^{aA}	97,9 ^{aA}	95,6 ^{aA}
	freezer	95,5 ^{aA}	95,1 ^{abA}	95,6 ^{aA}	94,9 ^{aA}	98,6 ^{aA}	96,2 ^{aA}
20	geladeira	95,5 ^{aAB}	96,0 ^{abA}	96,6 ^{aA}	92,9 ^{abAB}	97,0 ^{aA}	94,7 ^{aAB}
	freezer	94,0 ^{aAB}	88,1 ^{bBC}	95,9 ^{aAB}	97,4 ^{aA}	84,4 ^{bcC}	81,8 ^{bC}
28	geladeira	98,6 ^{aA}	96,9 ^{abA}	95,5 ^{aA}	SC	72,5 ^{deD}	87,9 ^{abABC}
	freezer	82,5 ^{bBCD}	88,6 ^{abABC}	87,5 ^{abcABC}	79,4 ^{bcCD}	76,3 ^{cdCD}	92,4 ^{abAB}
38	geladeira	SC ^{**}	SC	92,4 ^{abA}	75,7 ^{cC}	76,5 ^{cdC}	53,7 ^{cD}
	freezer	SC	SC	97,3 ^{abA}	77,4 ^{cBC}	89,4 ^{abAB}	84,3 ^{abABC}
45	geladeira	83,0 ^{bAB}	88,0 ^{bA}	79,3 ^{cAB}	74,7 ^{cABC}	63,6 ^{eCD}	00,0 ^{dF}
	freezer	69,4 ^{cBC}	53,9 ^{cD}	78,8 ^{cAB}	28,8 ^{dE}	69,7 ^{deBC}	49,1 ^{cD}

* Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas para a mesma umidade a cada duas linhas e minúsculas para cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** SC = sem contagem

O tempo de armazenamento não influenciou significativamente o percentual de germinação das sementes dos tratamentos T10 e T15 armazenadas em freezer e em geladeira e do tratamento T20 armazenadas em geladeira no período de 44 semanas. Todavia, segundo Gentil *et al.* (2001), temperaturas abaixo de 10°C não são indicadas para o armazenamento de sementes de café.

Em sementes de arroz foi observado que independentemente das condições em que foram conservadas, a qualidade diminuiu após 6 meses de conservação (Mata *et al.*, 1999).

O conjunto de dados obtidos demonstrou que, independentemente do grau de umidade considerado, a redução da temperatura de armazenamento tendeu a elevar, na média, o período de conservação das sementes e, ao mesmo tempo, que a redução do grau de umidade prolongou esse período independentemente da temperatura de armazenamento.

Entretanto, a perda da viabilidade de sementes armazenadas em baixas temperaturas é bastante lenta, o que requer um longo tempo experimental que apresenta muitos problemas logísticos (Vertucci *et al.*, 1994). Isto quer dizer que mais tempo de análises são necessários para a obtenção de um trabalho conclusivo.

4. CONCLUSÕES

- ◆ Para 44 semanas, as melhores condições de armazenamento se deu com umidade de 10 e 15% tanto em freezer (-18°C) como em geladeira ($8 \pm 2^\circ\text{C}$).
- ◆ Maiores perdas do poder germinativo foram observadas em sementes com umidades elevadas.
- ◆ Umidades de 45% favoreceram o crescimento de fungos em temperatura de geladeira a partir da 31ª semana de armazenamento.
- ◆ A melhor forma de estocagem de sementes deve ser conhecida para preservar a semente sob as melhores condições possíveis e minimizando custos de conservação.
- ◆ O conteúdo de água de sementes de pimenta longa para a manutenção da conservação aumenta com o decréscimo da temperatura de armazenamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. D.; BRAGA, N. R.; SANTOS, R. R.; GALLO, P. B.; PEREIRA, J. C. V. N. A. Comportamento de sementes de grão-de-bico na armazenagem. **Bragantia**, v. 56, n. 1, p. 97-102, 1997.

CARVALHO, N. **Sementes : ciência, tecnologia e produção**.. 2. ed Campinas: Fundação Cargill, 1988. 429 p.

BORÉM, F. M.; HARA, T.; SILVA, R. F.; ARAÚJO, E. F. Efeito da secagem e do armazenamento na germinação e no vigor de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 21, n. 1,2, p. 33-39, 1996.

CARVALHO, N. M. **A secagem de semente**, Jaboticabal: FUNEP, 1994, 165p.

COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p.357-369.

EMBRAPA/AC. Perguntas freqüentes sobre pimenta longa. Disponível em <http://www.embrapa.br/pimentalonga/faqs.htm> Acesso em 07/06/2001.

GENTIL, D. F. O.; SILVA, W. R.; MIRANDA, D. M. Grau de umidade e temperatura na conservação de sementes de café. **Bragantia**, v. 60, n. 1, p. 53-64, 2001.

HUNG, L. Q.; HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Constant, fluctuating and effective temperature and seed longevity: a tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) exemplar. **Annals of Botany**, v. 88, p. 465-470, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

MARODER, H. L.; PREGO, I. A.; FACCIUTO, G. R.; MALDONATO, S. B. Storage behaviour of *Salix alba* and *Salix matsudaan* seeds. **Annals of Botany**, v. 86, p. 1017-1021, 2000.

MATA, M. E. R. M. C.; MENEGALLI, F. C. Efeito da secagem a altas temperaturas por curtos períodos de tempo na germinação das sementes de feijão. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 60, n. 1, p. 53-64, 2001.

MATA, M. E. R. M. C.; BRAGA, M. E. D.; FIGUERÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Perda da qualidade fisiológica de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) armazenadas sob condições controladas. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 24, n. 1, 1999, p. 10 - 25.

OLSEN, M. H., N.; CREMASCO, M. A. Estudo da utilização de ciclos de resfriamento na secagem de sementes de arroz em batelada em leito de jorro cônico. In: **Anais II Congresso de Engenharia de Processos do MERCOSUL**, Florianópolis, 1999. (CD-ROM)

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P.S.; MAAS, C.H.; REBELO, R.A.; GIOTTO, C.R.; WENDHAUSEN JR., R.; LARGURA, G. e TAVARES, L.B.B. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta longa. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p. 18-23, n 15, julho-agosto - 2000.

PIMENTEL, F.A.; ROCHA, W. B.; CABRAL, W.G. **Colheita, beneficiamento e armazenamento de sementes de pimenta longa (*piper hispidinervium*)**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n.20, out/1999. 2p. (Série Instruções Técnicas).

PINHO DE SÁ, C.; PIMENTEL, F.A.; CABRAL, W.G.; SILVA, M.R.; PINHEIRO, P.S.N.; BEZERRA, A.L. **Coeficientes técnicos e custos para exploração da Pimenta longa**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n.8, nov/1998, 2p. (Série Instruções Técnicas).

ROCHA, S.F.R.; MING, L.C. *Piper hispidinervium* C.DC.(Piperaceae) - Uma fonte sustentável de safrol. Disponível em http://www.sne.org.br/congresso/resumos/desenvolvimento_sustentavel/68.htm Acesso em 05/02/2001.

SÁ, C. P.; PIMENTEL, F. A.; CABRAL, W. G.; SILVA, M. R.; PINHEIRO, P. S. N.; BEZERRA, A. L. **Coeficientes técnicos e custos para exploração da pimenta longa**. Acre: Embrapa/Acre, n. 8, nov./1998, 2p. (série Instruções Técnicas).

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista brasileira de fisiologia vegetal**. v. 12. p.74-84, 2000.

TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. **Manual das sementes – Tecnologia da produção**. Ed. Agronômica Ceres: São Paulo, 224p, 1977.

VALLE, R. C. S. C.; OCHNER, G.; VALLE, J. A. B.; DEBIASI, C.; TAVARES, L. B. B.; FURIGO JR. Influência das temperaturas de secagem e de armazenamento sobre a viabilidade germinativa de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) *in vitro*. A ser publicado, 2003.

VALLE, R. C. S. C.; OLIVEIRA, A. C.; OCHNER, G.; SCIPMANN, M. A.; DEBIASI, C.; TAVARES, L. B. B.; FURIGO JR. A. Estudo da concentração de reguladores de crescimento vegetal no meio de cultivo de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) para a produção de calo. In: **Anais VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Maringá, 2002. (no prelo)

VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E.; CRANE, J. Theoretical basis of protocols for seed storage III. Optimum moisture contents for pea seeds stored at different temperatures. **Annals of Botany**, v. 74, p. 531-540, 1994.

Capítulo V

Resultados e discussões

Este capítulo apresenta os resultados experimentais obtidos nos ensaios realizados, os quais sejam: otimização do uso de reguladores de crescimento para a formação de massa celular (calo) a partir de explantes de folhas de microplantas de *P. hispidinervium* cultivadas *in vitro*, estudo do crescimento celular em meio MS 37 com diferentes concentrações iniciais de sacarose, determinação da cinética de crescimento de células de pimenta longa em meio submerso em frascos agitados e estudo do crescimento celular em biorreatores aerados.




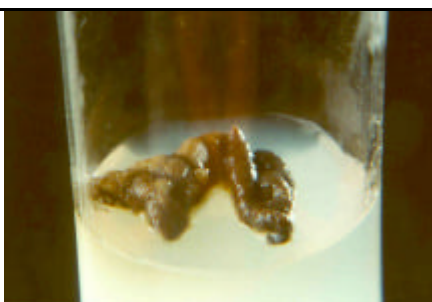

5.1. Otimização do uso de reguladores de crescimento para a formação de massa celular

A proposta deste estudo veio da necessidade de obter calos a partir de explantes de folhas de pimenta longa com padrões de friabilidade e rendimento necessários para a continuidade dos trabalhos com a produção de massa celular e safrol em meio submerso em biorreator aerado.


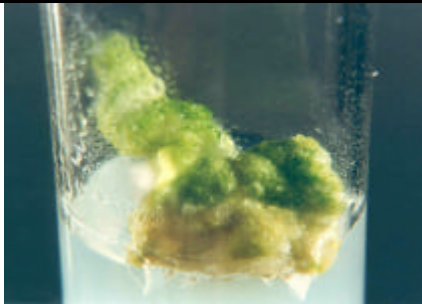
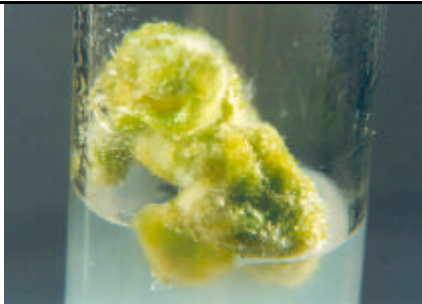
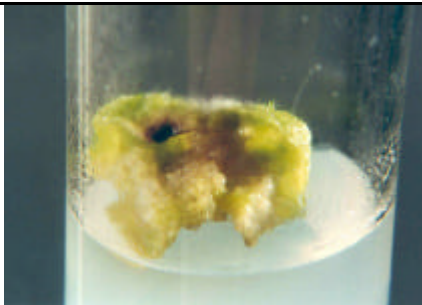

Para este estudo, foram realizadas 42 combinações variando-se a concentração e o tipo de reguladores de crescimento, sendo duas auxinas – 2,4D e ANA e duas citocininas – KIN e BAP (Tabela 3.1 – Capítulo de Material e Métodos). As avaliações dos experimentos foram realizadas sempre 30 dias após a inoculação do explante por meio de observação visual e os ensaios que apresentaram formação de massa, foram pesados e avaliados quanto à friabilidade.

Os resultados dos ensaios experimentais são apresentados na Tabela 5.1, onde há a descrição do comportamento e das características observadas nos explantes em contato com os meios contendo reguladores de crescimento em cada tratamento, juntamente com a foto que apresenta as principais características de cada tratamento.






Tabela 5.1 – Aspectos da morfogênese e calogênese *in vitro* e descrição das características adquiridas pelos explantes após os tratamentos realizados com reguladores de crescimento.

	Foto	Descrição do resultado
MS0		<ul style="list-style-type: none"> Os explantes apresentaram crescimento expressivo, coloração verde intensa e pontos de necrose na base. 50% dos explantes apresentaram raízes e formação de brotos.
MS1		<ul style="list-style-type: none"> Houve uniformidade dos resultados nas repetições; O explante apresentou pequeno crescimento sem formação de massa celular. Presença de necrose na base.
MS2		<ul style="list-style-type: none"> Os explantes apresentaram necrose na base sem crescimento significativo – foto. 40% dos explantes apresentaram necrose total.
MS3		<ul style="list-style-type: none"> 50% dos tubos apresentaram necrose total adquirindo coloração marrom dos explantes - foto. 50% dos tubos se apresentaram explantes em estágio avançado de degenerescência.
MS4		<ul style="list-style-type: none"> Uniformidade dos resultados. Os explantes apresentaram necrose em toda a extensão adquirindo coloração marrom clara.


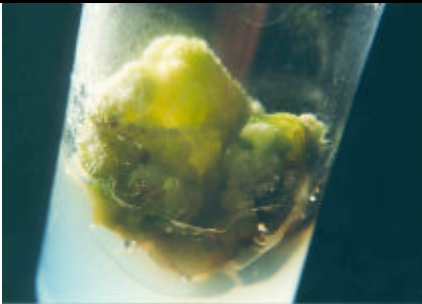
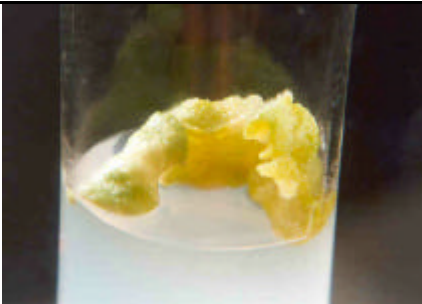

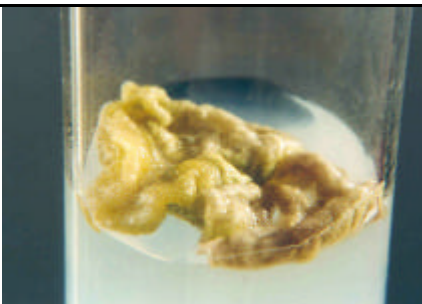
Continuação da Tabela 5.1 – Aspectos da morfogênese e calogênese *in vitro* e descrição das características adquiridas pelos explantes após os tratamentos realizados com reguladores de crescimento.

MS5		<ul style="list-style-type: none">• Uniformidade dos resultados.• Explantes em estágio avançado de degenerescência com colorações que variavam do marrom claro ao ocre. Sem crescimento expressivo dos explantes.
MS6		<ul style="list-style-type: none">• Uniformidade dos resultados.• Houve crescimento dos explantes com coloração verde intensa.• Pequena formação de massa celular.
MS7		<ul style="list-style-type: none">• Houve crescimento expressivo do explante e pequena formação de massa.• Coloração verde intensa.• 40% dos explantes apresentaram formação de raízes adventícias.
MS8		<ul style="list-style-type: none">• Uniformidade dos resultados.• Pouco crescimento dos explantes com sutil formação de massa celular e coloração verde claro e meio de cultivo sem alteração de cor.
MS9		<ul style="list-style-type: none">• 64% dos explantes apresentaram formação de raízes e coloração verde clara.• 35% apresentaram degeneração dos tecidos sem alteração do explante, e cor ocre.• 28% apresentaram formação de embriões com coloração verde clara.



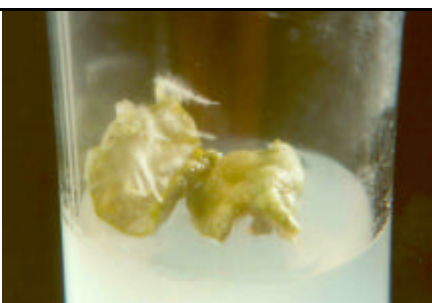


Continuação da Tabela 5.1 – Aspectos da morfogênese e calogênese *in vitro* e descrição das características adquiridas pelos explantes após os tratamentos realizados com reguladores de crescimento.

MS10		<ul style="list-style-type: none">• 86,6% dos explantes demonstraram formação intensa de raízes e 53% apresentaram raízes e embriões. Coloração verde clara – foto.• Tubos sem formação de raízes e/ou embriões apresentaram pelos em toda superfície.
MS11		<ul style="list-style-type: none">• 100% dos explantes apresentaram formação de raízes com características alongadas e 53,3% dos tubos com embriões.• Coloração verde intensa com pontes de escurecimento na base dos explantes
MS12		<ul style="list-style-type: none">• 100% dos os explantes demonstraram pouca formação de raízes e em 50% foi verificada a formação de embriões.• Houve pouco crescimento do explante e alguns explantes apresentaram na base.
MS13		<ul style="list-style-type: none">• Degeneração dos tecidos e pouco crescimento e sem formação de massa – foto.• Coloração ocre sem escurecimento do meio.
MS14		<ul style="list-style-type: none">• Houve crescimento dos explantes. Coloração verde intensa com extremidades em contato com o meio de cultura marrom.• Não houve formação de massa.

Continuação da Tabela 5.1 – Aspectos da morfogênese e calogênese *in vitro* e descrição das características adquiridas pelos explantes após os tratamentos realizados com reguladores de crescimento.

MS15		<ul style="list-style-type: none">• Crescimento expressivo dos explantes com coloração verde intensa.• Os explantes apresentaram pelos de coloração branca na superfície e sutil formação de massa nas bordas.
MS16		<ul style="list-style-type: none">• Os explantes se mostraram crescimento e intumescimento.• Apresentaram pouca formação de massa.• Coloração verde intensa com pontos brancos na superfície.
MS17		<ul style="list-style-type: none">• Crescimento dos explantes sem formação de massa com coloração verde clara.• 50% dos explantes apresentaram escurecimento na base.
MS18		<ul style="list-style-type: none">• Pouco crescimento dos explantes, com necrose na parte de contato com o meio.• 40% dos explantes apresentaram necrose completa.
MS19		<ul style="list-style-type: none">• Uniformidade dos resultados.• Explantes com degeneração com amolecimento do tecido.• Coloração verde tendendo a ocre.• Sem formação de massa, brotos ou raízes.


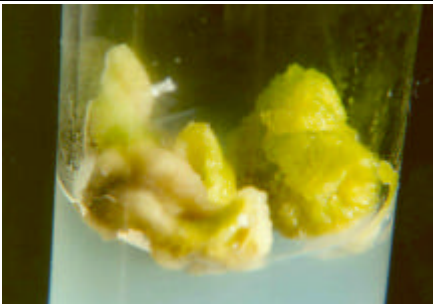
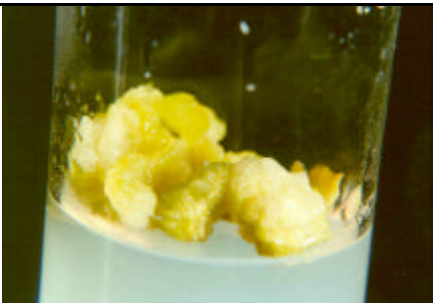

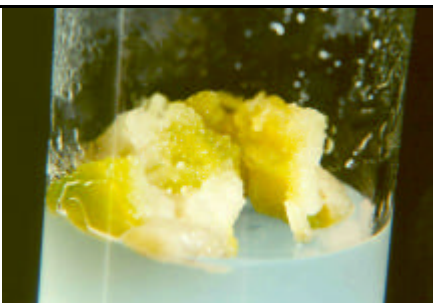
Continuação da Tabela 5.1 – Aspectos da morfogênese e da calogênese *in vitro* e descrição das características adquiridas pelos explantes após os tratamentos realizados com reguladores de crescimento.

MS20		<ul style="list-style-type: none">• Explantes intumescidos com coloração verde clara opaca.• Alguns tubos apresentaram amolecimento do tecido.• Não houve formação de massa celular.
MS21		<ul style="list-style-type: none">• Coloração verde intensa.• 46,6% dos tubos tiveram explantes com pequeno intumescimento sem formação de calo e 53,4% se apresentaram bastante corrugados com pequena formação de massa.
MS22		<ul style="list-style-type: none">• Houve formação de raízes.• Coloração verde clara, com 13% dos tubos apresentando tecidos em degeneração.• Não houve formação de massa celular.
MS23		<ul style="list-style-type: none">• 26,6% dos explantes apresentaram formação brotos e coloração verde intensa.• 53,3% dos explantes apresentaram início de necrose dos tecidos.• Todos apresentaram formação de raízes.
MS24		<ul style="list-style-type: none">• 73,3% dos explantes apresentaram degeneração dos tecidos e coloração que variou do verde ao marrom intenso.• 100% apresentaram formação de raízes e 60% com brotamento.

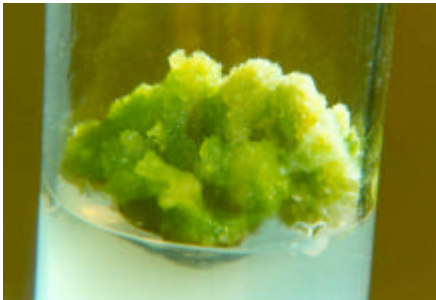

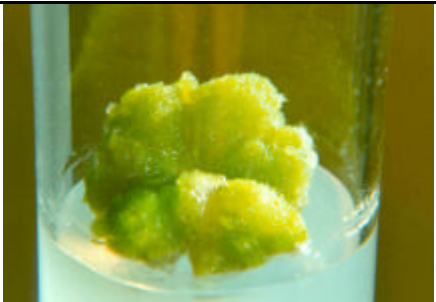


Continuação da Tabela 5.1 – Aspectos da morfogênese e da calogênese *in vitro* e descrição das características adquiridas pelos explantes após os tratamentos realizados com reguladores de crescimento.

MS25		<ul style="list-style-type: none">• Uniformidade dos resultados• Sem crescimento expressivo os explantes apresentaram degradação dos tecidos com coloração ocre.• Houve formação de raízes.
MS26		<ul style="list-style-type: none">• Uniformidade dos resultados.• Resultados semelhantes aos verificados no tratamento MS25.
MS27		<ul style="list-style-type: none">• Explantes com crescimento pouco expressivo com necrose nas bordas e coloração verde intensa na superfície.• Sem formação de massa.
MS28		<ul style="list-style-type: none">• Explantes com raízes alongadas.• Coloração verde amarelada.• Sem formação de brotos e/ou massa.• Alguns tubos demonstraram escurecimento próximo dos explantes.
MS29		<ul style="list-style-type: none">• Uniformidade dos resultados.• Houve a morte dos explantes ficando todos com coloração marrom e o meio com pigmentação da mesma cor.

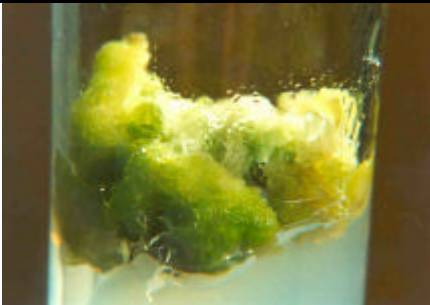

Continuação da Tabela 5.1 – Aspectos da morfogênese e da calogênese *in vitro* e descrição das características adquiridas pelos explantes após os tratamentos realizados com reguladores de crescimento.

MS30		<ul style="list-style-type: none">• Coloração verde intensa.• 60% dos tubos apenas demonstraram crescimento dos explantes.• 40% apresentaram formação de raízes.
MS31		<ul style="list-style-type: none">• Tecido com degeneração na base e coloração que variam do ocre ao verde intenso.• Explantes se apresentaram desuniformes no tamanho e não ocorreu diferenciação em raízes ou brotos.
MS32		<ul style="list-style-type: none">• Tecidos com coloração verde clara e bordas escurecidas.• Pouco desenvolvimento dos explantes com pouca formação de massa não friável (não quantificada).
MS33		<ul style="list-style-type: none">• Pouco desenvolvimento dos explantes.• 55,5% dos explantes apresentaram formação de raízes com coloração escurecida.• 44,5% dos explantes em estado degenerativo e coloração ocre.
MS34		<ul style="list-style-type: none">• Explantes apresentaram pouco crescimento sem formação de calo.• Coloração variou do verde claro ao ocre.• Alguns explantes apresentaram amolecimento dos tecidos.

Continuação da Tabela 5.1 – Aspectos da morfogênese e da calogênese *in vitro* e descrição das características adquiridas pelos explantes após os tratamentos realizados com reguladores de crescimento.

MS35		<ul style="list-style-type: none">• Resultado uniforme com explantes de coloração verde intensa e pouca formação de massa e crescimento dos explantes.• Explantes apresentaram diferenciação em brotos e raízes em fase inicial.
MS36		<ul style="list-style-type: none">• Resultado idêntico ao tratamento MS35.
MS37		<ul style="list-style-type: none">• Houve formação de massa celular.• Coloração verde clara.• Calo friável.• Meio sem escurecimento.
MS38		<ul style="list-style-type: none">• Pequeno crescimento dos explantes sem formação expressiva de massa.• Coloração verde intensa com pontos brancos na superfície.• Não houve diferenciação do tecido.
MS39		<ul style="list-style-type: none">• Os explantes apresentaram crescimento e coloração que variam do verde claro ao verde intenso no mesmo tubo.• Houve formação de massa na parte inferior do explante.

Continuação da Tabela 5.1 – Aspectos da morfogênese e da calogênese *in vitro* e descrição das características adquiridas pelos explantes após os tratamentos realizados com reguladores de crescimento.

MS40		<ul style="list-style-type: none"> • Houve crescimento dos explantes com coloração verde intensa. • Houve formação de massa celular não friável. • Meio sem alteração de cor.
MC24		<ul style="list-style-type: none"> • Os explantes apresentaram crescimento. • Em 60% dos explantes houve formação de massa celular, embriões e raízes. • 40% tiveram necrose dos explantes.

Ao se analisar os resultados obtidos nos 42 tratamentos realizados, verifica-se que a formação de calo foi notadamente afetada pelo tratamento hormonal, daí a importância de se definir tanto a concentração quanto o tipo de hormônio que deve ser empregado para que o objetivo seja alcançado, que no caso deste trabalho é a produção de massa celular (calo) para a utilização em ensaios em biorreator. O tipo de regulador de crescimento, sua concentração e a combinação de reguladores de crescimento determina a frequência de calogênese, morfologia do calo, indução e alongamento de brotos e raízes (Kelkar *et al.*, 1996). Neste sentido, pode-se verificar uma grande variedade de comportamentos dos explantes frente aos diferentes tratamentos, no que diz respeito à indução de calo, formação de raízes e brotos, necrose, coloração, crescimento e friabilidade.

Os tratamentos que apresentaram formação de calo em quantidade apreciável tiveram sua massa celular determinada e comparada com a massa total formada nos tubos de ensaio utilizados em cada tratamento. Foi observada formação de massa celular nos ensaios MS6, MS7, MS8, MS14, MS15, MS16, MS35, MS36, MS37, MS38, MS40 e, no meio proposto por Araújo (1998), o meio MC24. As massas determinadas estão demonstradas na Tabela 5.2. A massa inoculada nos tubos de

ensaio foi determinada através de pesagem de 70 explantes com tamanhos aproximados aos inoculados e com valor médio de 0,0054 g por explante.

Tabela 5.2 – Valores médios das massas determinadas nos tratamentos onde houve formação de calo.

Tratamento	Massa inicial dos explantes	Massa total*	Massa fresca de calo	IC
(g)				
MC24	0,1512	11,1301	1,4845	8,82
MS7	0,1404	15,7076	4,9704	34,40
MS8	0,1512	8,8849	2,3095	14,27
MS15	0,1404	14,5390	2,4707	16,60
MS16	0,1512	19,3499	2,4598	15,27
MS35	0,1620	14,3441	8,1375	49,23
MS36	0,1620	16,7475	6,2294	37,45
MS37	0,1404	12,3241	10,4873	73,69
MS38	0,1620	12,3822	2,4097	13,87
MS40	0,1728	20,4971	9,6088	54,61

* Massa total = massa de calo adicionada da massa de tecido não indiferenciado.

Observando a Tabela 5.2, verifica-se que o tratamento MS37 demonstrou melhor formação de massa e com pequena diferença da massa total formada, o que significa que houve conversão de grande parte do explante em calo. É desejável que a relação entre o total de massa formada e a massa de calo seja o mais estreita possível, uma vez que isto facilita a manipulação do calo durante a inoculação em meio líquido, tarefa que deve ser realizada de forma rápida para não haver injúrias nas células, prejudicando ensaios posteriores. A formação completa de calo também diminui o número de operações a ser realizada na transferência para o meio líquido diminuindo o risco de contaminação. Por meio do índice de crescimento (IC) pode-se observar melhor a superioridade da combinação de reguladores de crescimento do meio MS37 sobre as demais combinações, sendo que este apresentou IC 26% maior que o meio MS40.

Como não existe literatura sobre a produção de calo de *P. hispidinervium*, não existem dados comparativos com os obtidos neste trabalho.

O tratamento MS37 proporcionou a formação de calos friáveis de coloração verde intensa. A coloração dos demais tratamentos foi semelhante à observada no meio MS37, contudo houve diferenças na friabilidade. O tratamento MS40, o qual demonstrou uma boa formação de massa celular, apresentou menor friabilidade em relação ao calo MS37. Segundo Pescador *et al.* (2000), a característica de friabilidade do calo é favorecida por uma alta relação auxina/citocinina, bem como pela adição de outros componentes ao meio nutritivo, mas neste estudo foi verificado que uma combinação pró citocinina (MS37 = 22,62 μ M de 2,4D + 45,25 μ M de BAP) foi mais adequado ao comportamento desejado, podendo ser justificado com a definição dada por Barciszewski *et al.* (1999) que diz “citocinina é o nome genérico usado para designar uma substância do crescimento da planta que promove a divisão celular...”. Morales *et al.* (1999) descrevem que freqüentemente se induz a formação de calos em explantes cultivados em meio contendo auxina ou com uma alta relação citocinina/auxina, concordando com os resultados observados neste trabalho.

Apesar das concentrações de auxinas e citocininas serem as mesmas nos tratamentos MS37 e MS40, a diferença residiu no composto adicionado como auxina, sendo que o 2,4-D proporcionou maior formação de massa. Segundo Ammirato (1983), citado por Flores *et al.* (1998), o 2,4-D é um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos. Morales *et al.* (1999) descrevem que a presença de altas concentrações de citocininas no meio induz a excessiva formação de calos em explantes de espécies lenhosas. Em cultura de limão “Rugoso”, houve formação de calos friáveis em presença de 2,4-D, enquanto que em presença de ANA o calo se mostrou duro (Benedito *et al.*, 2000).

O meio proposto por Araújo (1998), MC24, anteriormente utilizado no Laboratório de Biotecnologia – Micropropagação Vegetativa da Universidade Regional de Blumenau, não mostrou uma formação de massa satisfatória, tendo apresentado 86% menos massa que o meio proposto no tratamento MS37.

Foi observado que dentre os tratamentos que apresentaram formação de raízes, os quais perfizeram 17 dos 42 ensaios, 11 continham em sua composição cinetina (KIN) e ácido α -naftalenoacético (ANA), independentemente da concentração imposta. Essa combinação de KIN e ANA não foi concordante com estudos demonstrados por Mathews & Rao (1984) e realizados com uma outra Piperácea, a

Piper nigrum, no qual os autores obtiveram formação de calos em 100% das replicatas. Em calogênese de cupuaçu, o ácido naftaleno acético promoveu o aparecimento de raízes (Ferreira *et al.*, 2001).

A concentração ideal (MS37) de reguladores de crescimento foi elevada em comparação com a maioria dos trabalhos consultados, Catapan *et al.* (2001), por exemplo. Segundo Su (1995) elevados níveis de auxina favorecem a desdiferenciação via estimulação da divisão celular e no caso da *P. hispidinervium*, foi verificado que em concentrações mais baixas houve diferenciação com formação de raízes e partes aéreas em alguns casos.

Ferreira *et al.* (2001) observaram que concentrações mais elevadas de 2,4-D (4-8 mg/L) apresentaram boa formação de calos friáveis em seguimento cotiledonares de cupuaçu. Os mesmo autores citam que, segundo Janick (1988), altas concentrações de 2,4-D adicionado de água de coco estimulam a produção de calo e anulam a indução de embrião.

Sellés *et al.* (1997) descrevem que 1 mg/L de 2,4 D foi suficiente para a formação de calo e que elevadas concentrações (10 mg/L) estimularam a formação de calos regenerativos (calos totipotentes) para ensaios com *Narcissus confusus*.

Alguns tratamentos demonstraram formação de raízes e brotos simultaneamente, não tendo sido verificado a formação de brotos exclusivamente. Como não foi verificada uma relação entre tipo e concentração de reguladores de crescimento com a formação de brotos e raízes, é possível que esse efeito esteja relacionado com a concentração endógena de hormônios dos próprios explantes.

Três tratamentos apresentaram necrose total dos tecidos, os tratamentos MS3, MS4 e MS29, em todos a concentração de citocinina não foi superior a 2,32 μ M, o que poderia sugerir que explantes de *P. hispidinervium* necessitam de elevadas concentrações de citocininas para a manutenção do metabolismo celular.

Alguns dados relevantes para a produção de massa celular a ser utilizada nos ensaios em meio líquido foram observados. A formação de calos se dá em 30 dias de cultivo, apresentando coloração verde intensa e boa friabilidade (Figura 5.1), estando aptos para utilização nos ensaios em meio líquido. O mesmo tempo (4 semanas) para a formação de calo foi verificado por Eshita *et al.* (2000) com *Ulmus americana*.

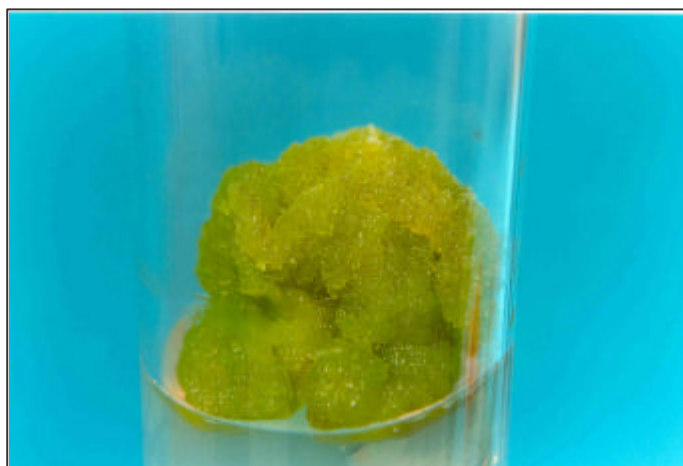


Figura 5.1 - Calo friável de pimenta longa formado em meio MS37, após 30 dias de cultivo em tubo de ensaio.

A friabilidade é uma característica importante para garantir a presença de material celular o mais finamente dividido, de forma que as células se encontrem mais separadas, ou seja, sem presença de agregados celulares o que possa comprometer a transferência de nutrientes, oxigênio e gás carbônico do meio líquido para as células e a excreção de metabólitos que possam se tornar tóxicos às células.

A partir de 40 - 45 dias de cultivo os calos iniciaram um processo de degradação, apresentando escurecimento da massa e do meio (Figura 5.2). Os compostos pigmentados formados nos calos podem estar relacionados à senescência do calo como uma resposta ao estresse surgido frente a um possível déficit de hormônios, nutrientes ou água, condições que provocam um aumento em radicais livres (Arnaldos *et al.*, 2001).

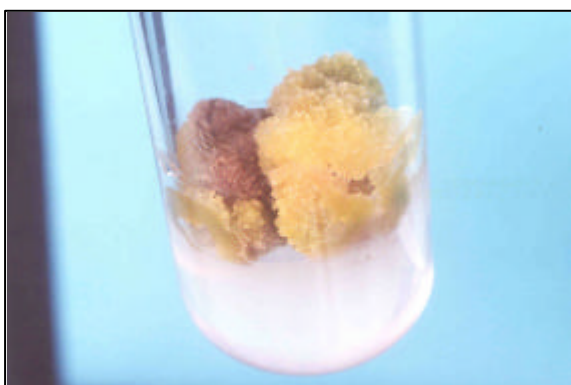


Figura 5.2 – Calos de pimenta longa em fase inicial de degradação apresentando escurecimento das células.

De acordo com os resultados obtidos com a otimização do meio de cultivo para produção de massa celular de pimenta longa, para o andamento dos ensaios foram realizados estudos utilizando-se o meio MS37 (meio MS adicionado de 30 g/L de sacarose, 7g/L de ágar e dos reguladores de crescimento 2,4D - ácido 2,4 diclofenoxiacético – em concentração de 22,62 μ M e BAP - 6 benzilaminopurina – em concentração de 45,25 μ M) para a etapa de estudos em meio líquido.

Cuidados devem ser observados com relação à restrição de tempo entre o calo estar formado e saudável e o início da degeneração das células que formam o calo, uma vez que esse período é de no máximo 10 dias. As células a serem introduzidas no biorreator devem apresentar com coloração uniforme e com boa friabilidade.

5.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SACAROSE SOBRE A MULTIPLICAÇÃO CELULAR EM MEIO LÍQUIDO

A concentração final de células no meio (massa seca) foi significativamente afetada pela concentração inicial de sacarose no meio. Os valores determinados de concentração celular e carboidratos totais residuais estão demonstrados nas Figuras 5.3 e 5.4, respectivamente. Na Figura 5.5 estão apresentados valores relativos à viabilidade celular, representados como absorbância por grama de célula.

Como demonstrado na Figura 5.3, a melhor condição de obtenção de massa celular em 30 dias de cultivo (tempo estipulado para esse ensaio) foi verificada no tratamento T30. Os tratamentos T10 e T50 não diferiram significativamente entre si e os baixos rendimentos em célula apresentados podem ser, no ensaio com 10 g/L de sacarose, devido a uma limitação de fonte de carbono no meio durante o cultivo e, em T50, pode ter ocorrido uma inibição inicial do crescimento pelo estresse causado pela elevada concentração de sacarose e não ter havido tempo suficiente, durante os 30 dias de cultivo, para o restabelecimento e crescimento celular. A mesma análise pode ser feita para os ensaios T5 e T60, os quais também não apresentaram diferenças significativas entre si, contudo a inibição do crescimento celular com 60 g/L foi maior que com 50 g/L de sacarose.

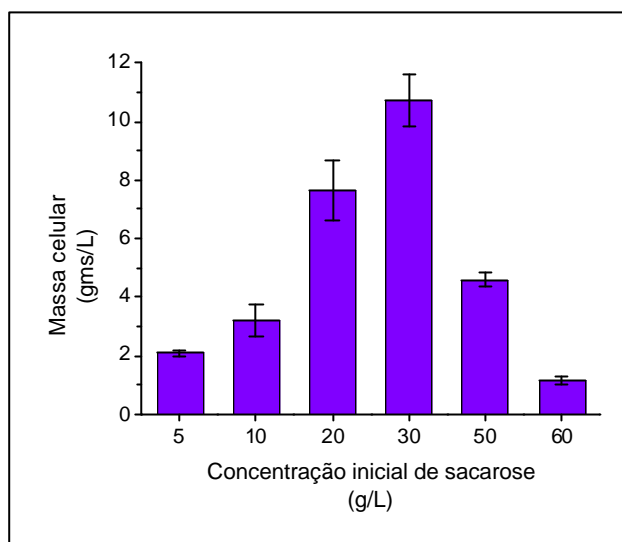


Figura 5.3 - Biomassa (massa seca) acumulada em 30 dias de cultivo em frascos agitados contendo meio MS37 e concentrações iniciais de sacarose de 5, 10, 20, 30, 50 e 60 g/L.

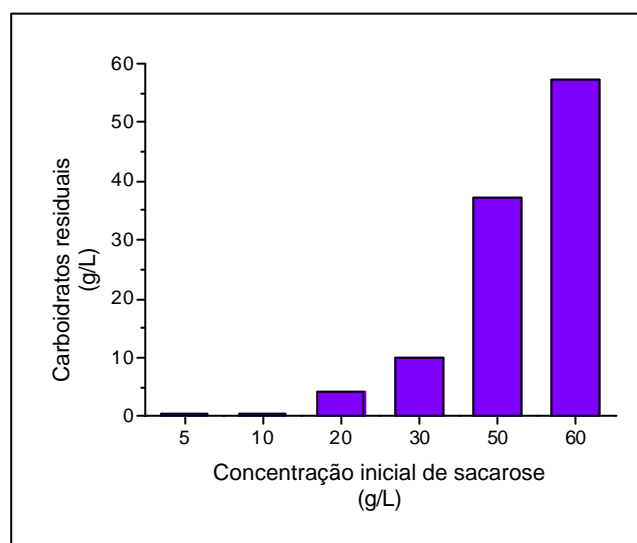


Figura 5.4 - Concentração de carboidratos residuais no meio de cultivo determinada após 30 dias de cultivo iniciados com concentrações de 5, 10, 20, 30, 50 e 60 g/L de sacarose no meio.

Takeda *et al.* (1998) observaram que o crescimento celular se deu melhor a 30 g/L de sacarose que em 15 g/L. Sato *et al.* (1996), que também verificaram um menor crescimento celular com o aumento da concentração inicial de sacarose, descreveram

que o decréscimo do crescimento celular no meio contendo altas concentrações de sacarose pode ter sido causado pelo aumento do potencial osmótico, ou pela elevada viscosidade do meio.

Em contrapartida, Wang *et al.* (1999) demonstraram que maiores concentrações de células foram obtidas à medida que a concentração inicial de sacarose imposta era maior. Contudo, o tempo de cultivo em que as massas celulares se mostraram máximas, foi mais prolongado.

Gertlowski & Petersen (1993) demonstraram que o acúmulo de células em suspensão de *Coleus blumei* foi forte e positivamente influenciado pela concentração crescente no meio. Entretanto, o tempo de cultivo garantiu que os carboidratos presentes no meio reduzissem a valores de concentração próximos a zero. Esse resultado sugere que tempo (30 dias) que os ensaios com concentrações iniciais de sacarose superiores a 20 g/L foram realizados foi insuficiente para a máxima produção de células de pimenta longa, isto porque, os cultivos com concentrações maiores de sacarose ao final apresentavam concentrações elevadas de carboidratos no meio (Figura 5.4) e se apresentavam com boa viabilidade celular (Figura 5.5), comparativamente ao ensaios com baixas concentrações iniciais de sacarose. Aparentemente, 30 dias de cultivo foi ideal para o ensaio de 20g/L.

O comportamento das células sob as diferentes concentrações de sacarose se mostrou semelhante. Inicialmente as células ao serem inoculadas apresentaram uma coloração verde intensa e essa coloração, com o passar dos dias demonstrou um escurecimento gradual até atingir um tom de verde próximo ao verde oliva ao final de uma semana. Os ensaios T5, T10 e T60 apresentaram matéria celular com tonalidade marrom ao final de 30 dias de cultivo, o que pode estar demonstrando que houve morte celular ou que as células se encontram numa condição de estresse que motivasse a alteração de coloração.

Na Figura 5.5 pode-se verificar que as células de *P. hispidinervium* se mostraram mais viáveis no ensaio com concentração inicial de sacarose de 30 g/L em 30 dias de cultivo. Os cultivos com baixas concentrações de sacarose apresentaram uma viabilidade menor comparativamente a viabilidade das células no ensaio T30, sendo que a absorbância lida nas células dos tratamentos T5 e T10 demonstram que não havia células viáveis no momento dos testes, o que justifica a coloração escura detectada e citada anteriormente.

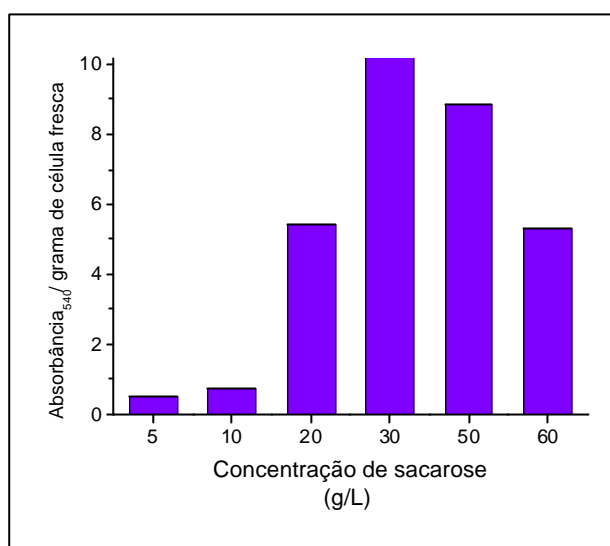


Figura 5.5 - Viabilidade celular relativa de células de *P. hispidinervium* determinada ao final do cultivo em frascos agitados com diferentes concentrações iniciais de sacarose, 5, 10, 20, 30, 50 e 60 g/L.

No ensaio com 60 g/L de sacarose, a coloração marrom pode estar indicando que as células sofreram um grande estresse, mas que poderiam estar numa fase de recuperação, uma vez que a viabilidade celular se mostrou com valores da ordem de 5,2, não apresentando a morte celular completa como observado nos ensaios T5 e T10. Por meio do ensaio de viabilidade celular pode-se confirmar que pode ter havido insuficiência de tempo de cultivo nos ensaios com concentrações elevadas de sacarose. A pressão osmótica relativamente alta, provocada pelo conteúdo de sacarose no meio reprimiu o crescimento celular (Zhang *et al.*, 1996).

Martinez & Park (1993) também observou que a viabilidade de células de *Coleus blumei* em cultivo submerso em *shaker* apresentou melhor viabilidade celular em cultura realizada com 30 g/L de sacarose, quando comparado à outras culturas com concentrações de sacarose diferentes (10, 20, 40, 50, 60 e 70 g/L). Os autores atribuem a perda da viabilidade celular sob baixas concentrações de sacarose à limitação de açúcar, e sob elevadas concentrações, ao elevado potencial osmótico, o que provoca inibição.

Os efeitos das concentrações iniciais de sacarose sobre células de pimenta longa estão mostrados na Tabela 5.3. A metodologia de cálculo utilizada para a determinação dos parâmetros pode ser verificada no capítulo de Material e Métodos.

Tabela 5.3 - Efeito das concentrações iniciais de sacarose sobre a concentração máxima de célula em massa seca (X_{\max}), o fator de conversão de carboidratos em célula ($Y_{X/S}$), a velocidade de consumo de sacarose (r_s) e o valor de pH do meio (final) em cultivos em suspensão de *P. hispidinervium* realizados em frascos agitados.

Parâmetros	Concentração inicial de sacarose (g/L)					
	5	10	20	30	50	60
X_{\max} [gms/L]	2,1	3,2	7,6	10,7	4,6	1,5
r_s [g/L.d]	-	-	0,53	0,67	0,43	0,087
$Y_{X/S}$ [gms/g]	0,236	0,233	0,419	0,486	0,278	0,063
pH	6,95	7,08	5,75	5,56	5,21	5,25

Como se pode confirmar na Tabela 5.3, a concentração de 30 g/L de sacarose apresentou-se mais adequada ao cultivo de células de *Piper hispidinervium* em termos de r_s , de $Y_{X/S}$ e de X_{\max} em cultivos de 30 dias. A concentração de células no tratamento T30 foi 29, 70 e 80,3 % maior que em T20, T10 e T5, respectivamente. Tendo em vista que as concentrações de carboidratos residuais (Figura 5.4) foram muito reduzidas no final do experimento, pode-se dizer que a sacarose se apresentou como um substrato limitante quando em concentrações menores que 30 g/L. A sacarose em concentrações maiores que 30 g/L pode estar atuando como um inibidor do crescimento celular, tendo em vista o menor crescimento celular observado nos tratamentos T50 e T60.

O fator de conversão de substrato em célula do ensaio T30 foi superior ao descrito por Akalesi *et al.* (1999) em cultivo de *Panax ginseng* (0,17 gms/g) com concentrações semelhantes de inóculo, mas o mesmo autor obteve $Y_{X/S}$ de 0,13 gms/g com concentrações de sacarose de 60g/L, o dobro do valor obtido com pimenta longa em T60.

Os valores de pH determinados nos cultivos apresentaram variações. Podendo o pH ser um indicador da utilização de nitrogênio e açúcares pelas células (Lee & Shuler, 2000), pode-se dizer que os valores de pH medidos nos ensaios T50 e T60 refletem a ocorrência de consumo de amônia, fato que ocorre em tempos iniciais de cultivo, ou seja, quando as células estão em fase de adaptação. Esta observação

pode confirmar a afirmação já feita sobre a possível recuperação das células nos tratamentos T50 e T60.

A maior alcalinidade determinada nos ensaios T5 e T10 pode ser em decorrência de rompimentos de membranas e exposição ao meio de cultivo de compostos intracelulares, visto que valores acima de 6 são elevados para estarem associados a consumo de nutrientes, não tendo sido encontrados valores semelhantes na literatura consultada.

Como todos os tratamentos foram conduzidos durante o mesmo tempo, não é possível estabelecer o valor real da velocidade de consumo de substrato dos tratamentos T5 e T10, visto que não é conhecido o tempo em que a sacarose foi consumida.

Está evidente que a concentração inicial de sacarose é importante para o crescimento celular, mas segundo Wang, *et al.* (1999), esse efeito é dependente da linhagem celular.

5.3. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DE *P. hispidinervium*

Muito pode ser entendido conhecendo-se o comportamento básico do crescimento de células de plantas. Nas Figuras 5.6, 5.7 e 5.8, estão apresentadas curvas típicas de crescimento de células de pimenta longa e consumo de carboidratos solúveis totais.

Observando as curvas de crescimento celular nota-se que apenas o ensaio realizado sob luz tem-se o consumo total dos carboidratos no tempo em que o ensaio foi realizado (40 dias) e com isso, nesse tempo, as células estariam entrando numa condição de limitação de carbono no meio, e por consequência dessa limitação, estariam entrando numa fase de desaceleração do crescimento celular.

Os ensaios realizados no escuro e com adição de quitosana não apresentaram a fase de desaceleração muito clara, e em ambos tratamentos as células não se encontram sob limitação de carbono no meio. Como a concentração de carboidratos que está presente no meio ao final do cultivo no escuro se refere à presença de frutose, (Figura 5.11), a célula pode apresentar velocidade diferente frente a este substrato, como sugerem os dois pontos no final da curva de crescimento. Células de

Podophyllum hexadrum demonstraram taxas de crescimentos diferentes quando cultivadas em glicose ($0,11 \text{ dia}^{-1}$) e sacarose ($0,075 \text{ dia}^{-1}$) (Chattopadhyay *et al.*, 2002).

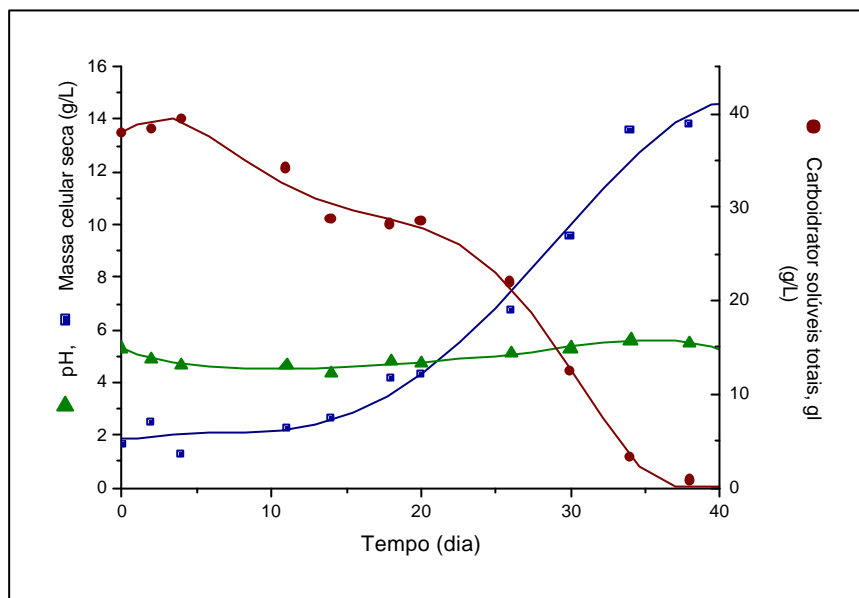


Figura 5.6 - Perfil de crescimento celular, consumo de substrato e pH do meio em cultivo de células de *Piper hispidinervum* em meio MS37 em shaker com iluminação de 2500 Lux e fotoperíodo de 16 horas luz/dia.

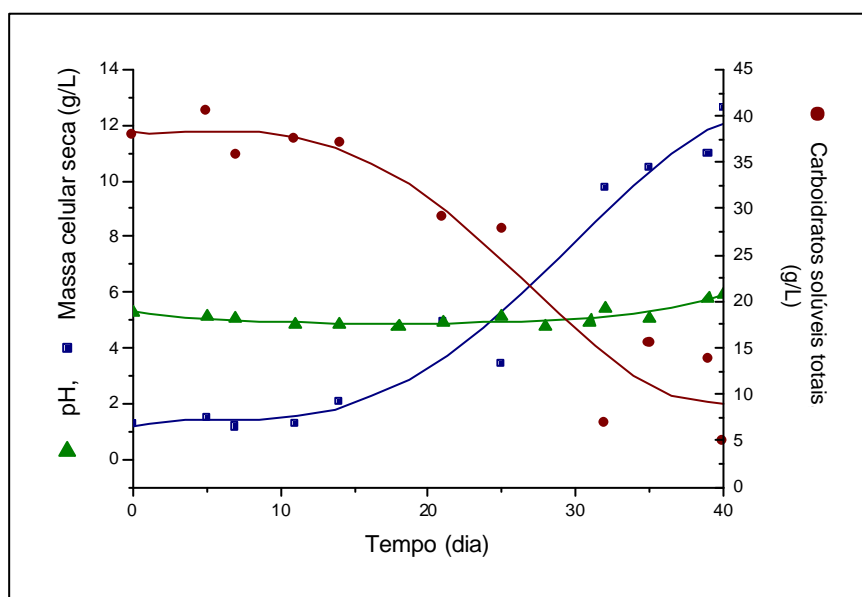


Figura 5.7 - Perfil de crescimento celular, consumo de substrato e pH do meio em cultivo de células de *Piper hispidinervum* em meio MS37 em shaker no escuro.

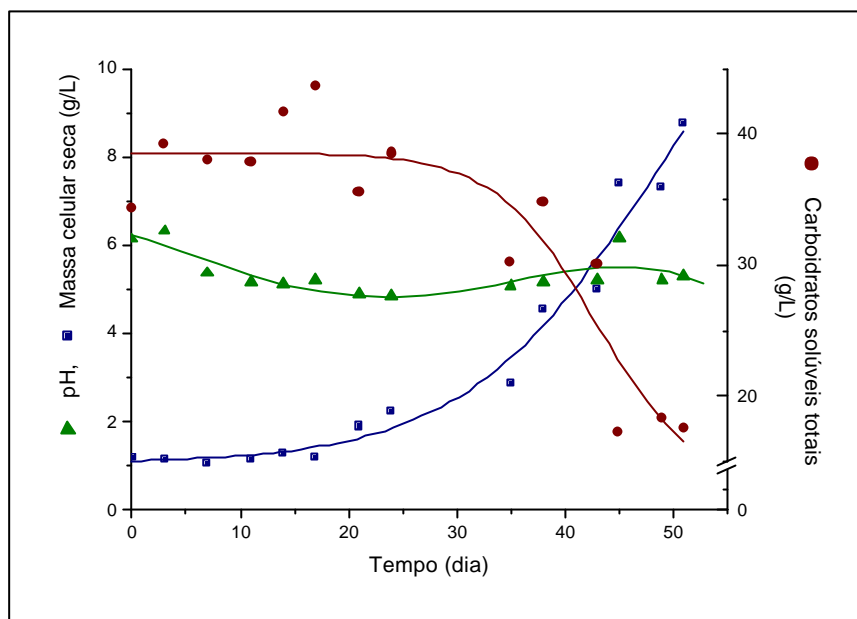


Figura 5.8 - Perfil de crescimento celular, consumo de substrato e pH do meio em cultivo de células de *Piper hispidinervum* em meio MS37 com quitosana, em shaker com iluminação de 2500 Lux e fotoperíodo de 16 horas luz/dia.

Os três tratamentos demonstraram uma fase lag prolongada, provavelmente devido ao estresse que as células tiveram ao mudarem do meio sólido, onde estão em contato com o ar, para o meio submerso, onde existem grandes diferenças, principalmente em termos de agitação, oxigenação e potencial osmótico. Com esse estresse provocado pela mudança de meio de cultivo, as células têm sua viabilidade reduzida e subseqüentemente recuperada após adaptação das células (Martinez & Park, 1993). A fase lag pode ser minimizada utilizando-se células pré-cultivadas em condições semelhantes às condições em que serão realizados os ensaios, a utilização de densidades de inóculo elevadas também pode minimizar a fase lag (van Gulik *et al.*, 1994).

Entre os ensaios realizados no escuro e sob luz não foram observadas diferenças apreciáveis nos perfis de crescimento celular, ambos apresentaram uma fase lag em torno de 10 dias de cultivo. Se a fase lag de crescimento for descontada dos perfis de crescimento nos dois tratamentos sem elicitación, pode-se dizer que o tempo de crescimento de 20 e 30 dias para os ensaios sob luz e no escuro, respectivamente, é compatível com tempos de cultivos de outras espécies em

condições semelhantes relatados na literatura (Chattopadhyay *et al.*, 2002; Linden *et al.*, 2000; Akalezi, *et al.*, 1999; Fett-Neto *et al.*, 1994).

No ensaio com quitosana, as células, além de precisarem adaptar-se ao novo meio, ainda sofreram o estresse causado pela presença do elicitor. Em virtude disto, a fase lag apresentada neste ensaio, é mais longa (~18 dias) que nos demais ensaios.

Inicialmente, durante a fase lag dos três tratamentos há um baixo consumo de carboidratos, fato que pode estar relacionado não somente devido às células não se encontrarem em pleno desenvolvimento, mas também, por estas estarem fazendo uso das reservas de carboidratos (Srinivasan *et al.*, 1995).

O início da fase exponencial de crescimento celular é coincidente com o aumento do consumo de carboidratos e perdurou por aproximadamente 20, 32 e 45 dias, com valores de μ_{\max} de 0,078; 0,077 e 0,054 dia^{-1} (Tabela 5.4), nos ensaios sob luz, no escuro e com quitosana, respectivamente. Este resultado sugere que a duração da fase exponencial é tanto menor quanto maior for a velocidade específica máxima de crescimento. Apesar da fase de crescimento ser mais duradoura no cultivo com quitosana, o crescimento ocorre de forma mais lenta, provavelmente devido às células se encontrarem sob estresse provocado pela ação da quitosana.

O tempo da fase exponencial de crescimento em outras culturas encontrado na literatura é variável, por exemplo, em células de morango a duração foi de 9-10 dias (Zhang *et al.*, 1998), 14 dias para *Taxus chinensis* (Choi *et al.*, 2000), 18 dias com *Rauwolfia sellowii* (Rech, *et al.*, 1998) e 26 dias em cultura de *Taxus baccata* (Hirasuna *et al.*, 1996).

Apesar da fase estacionária não se apresentar definida é possível verificar nos ensaios MS37 e MS37 no escuro que há um início de desaceleração no crescimento celular, o qual é coincidente com a redução da concentração da fonte de carbono no meio, o mesmo comportamento foi verificado por Zhang *et al.* (1998). Os mesmos autores verificaram que o total consumo de carboidratos se deu em tempo muito próximo ao de consumo de amônia e de nitrato, sendo coincidente com a significativa redução da viabilidade de células de morango.

No ensaio com quitosana, em que a concentração de carboidratos solúveis totais ainda permaneceu presente em 52 dias de cultivo, a fase de desaceleração não se verificou, estando as células em fase exponencial de crescimento. Esse resultado demonstra que a sacarose pode ser um fator limitante do crescimento caso não esteja

em concentrações adequadas, apesar de outros nutrientes também poderem estar em depleção, o que também pode ser limitante.

Especificamente no meio MS37 sob luz, o consumo de carboidratos totais demonstrou um perfil caracterizado por duas fases distintas, uma até o 20º dia e outra a partir do 20º dia até o 40º dia. Esse tempo corresponde ao início da fase exponencial de crescimento celular. A taxa de consumo de açúcar é maior na segunda fase que na primeira. Esse mesmo perfil característico foi verificado por Wang & Zhong (1999) com *Taxus chinensis* em 40 e 50 g/L de sacarose.

Foi observado visualmente um progressivo aumento da pigmentação escura durante o ciclo de crescimento das células de pimenta longa.

Na Tabela 5.4 estão apresentados os parâmetros cinéticos calculados para os ensaios em MS37 em presença e ausência de luz e MS37 com quitosana.

Tabela 5.4 - Efeito das diferentes condições de cultivo sobre a concentração máxima de célula em massa seca (X_{\max}), o fator de conversão de carboidratos em célula ($Y_{X/S}$), a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), a produtividade em célula (P_X) e o tempo de geração (T_g) em cultivos em suspensão de células de pimenta longa realizados em frascos agitados.

Condições de cultivo	X_{\max} [gms*/L]	$Y_{X/S}$ [gms*/g]	μ_{\max} [d ⁻¹]	P_X [gms*/L.d]	T_g [d]
MS37 sob luz	13,8	0,361	0,078	0,337	8,9
MS37 no escuro	12,6	0,322	0,077	0,290	9,0
MS37 com Quitosana	8,7	0,274	0,054	0,151	12,8

* gms = grama de massa seca

Observando-se a Tabela 5.4, verifica-se que entre os ensaios sob luz e no escuro não apresentam diferenças acentuadas, o comportamento foi verificado em culturas de *Marchantia polymorpha* (Chiou *et al.*, 2001) e de *Oriza sativa* (Lui *et al.*, 2001). Em contrapartida, para culturas de *Coffea arabica*, a intensidade luminosa afetou não somente o crescimento como também a produção de alcalóides (Kurata *et al.*, 1997). O tratamento com quitosana tem os valores de seus parâmetros mais distanciados dos outros dois tratamentos, demonstrando que o elicitor provocou estresse às células reduzindo o crescimento celular, também constatado por

Bhagwath & Hjortso (2000) com *Ambrósia artemisiifolia* e por Linden & Phisalaphos (2000) com *Taxus canadensis*.

As concentrações de massa de célula seca obtidas nos ensaios sem elicitação, 13,6 e 12,6 gms/L, foram superiores, aos obtidos com *Coleus blumei* em 30 g/L de sacarose – 9,8 gms/L (Martinez & Park, 1993), com *Anchusa officinales* na mesma concentração de sacarose – 11,6 gms/L (De-Eknamkul & Ellis, 1985), *Taxus baccata* – 10 e 11 gms/L (Hirasuna *et al.*, 1996) , *Taxus chinensis* – 12,3 gms/L (Choi *et al.*, 2000), *Eschscholtzia californica* – 11,3 gms/L. Jianfeng *et al.* (1998) obteve 13,19 gms/L de células de *Rhodiola sachlinensis* em cultivo em reator tipo *air lift* com volume de 10 litros.

A concentração máxima de biomassa de *P. hispidinervium* obtida em 52 dias de cultivo com quitosana foi 36% menor que a obtida nas mesmas condições sem quitosana. Resultado semelhante foi verificado por Chiou *et al.* (2001) com *Marchantia polymorpha*, com diferença de 26,7% entre o cultivo com 100 ppm de quitosana e sem quitosana. A elicitação também foi prejudicial para o crescimento celular em cultivo de *Catharanthus roseus* (Zhao *et al.*, 2001). Culturas de *Papaver somniferum* demonstraram uma limitação na formação de massa celular seca em presença de quitosana, atingindo uma massa de 8,7 gms/L (Archambault *et al.*, 1996)

Foram obtidos valores de fatores de conversão de 0,361, 0,322, e 0,274 gms/g nos ensaios em MS37 sob luz, no escuro e com quitosana, respectivamente. Houve semelhança nos valores de $Y_{X/S}$ dos ensaios sob luz e no escuro sem elicitação com respeito à utilização de substrato, apesar do ensaio no escuro ter sido realizado em um tempo maior que o ensaio sob luz. Valores semelhantes foram obtidos por Kanokwan & Doran (1997), com *Atropa belladonna* em *shaker* e com 30 g/L de sacarose. *Podophyllum hexandrum* demonstrou maior um $Y_{X/S}$ de 0,31 gms/g quando cultivada no escuro e de 0,22 gms/g sob fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro (Chattopadhyay *et al.*, 2002).

O ensaio realizado em meio MS sob luz se mostrou mais o produtivo, mas as produtividades em célula nos três ensaios foram baixas comparadas àquelas descritas na literatura, como, por exemplo, 2,3 gms/L.d em cultivo de *Catharanthus roseus* (Scragg *et al.*, 1990). Entretanto, é possível constatar que existe uma grande variabilidade de valores para esse parâmetro para as diferentes espécies. Pode-se citar, por exemplo, P_X igual a 0,69 gms/L.d para *Marchantia polymorpha* (Chiou *et al.*, 2001).

O tempo de geração (tg) obtido foi de 8,9 e 9 d, se mostrando demasiado prolongado comparativamente aos obtidos por outros autores. Panda *et al.* (1992) obtiveram tg de 2,75 d em cultivo de *Holarrhena antidysenteriva* com a mesma concentração inicial de inóculo utilizada neste trabalho. O tg alcançado por Hirasuna *et al.* (1996) com cultivo de *Taxus baccata*. Rech *et al.* (1998) foi 71 hora (~3 dia) com cultivo de *Rauwolfia sellowii* em *shaker*.

Diversos estudos ainda são necessários para que o cultivo *in vitro* de pimenta longa seja considerado eficiente em termos de velocidade específica de crescimento (μ_{\max}), já que se pode encontrar reportadas velocidades da ordem de 0,4 d⁻¹, com *Pyrus communis* (Ryu *et al.*, 1990) e com *Catharanthus roseus* (Scragg *et al.*, 1990). Todavia, existe uma grande variedade de valores de velocidades específicas máximas de crescimento apresentadas na literatura. Em *shaker* são citadas velocidades específicas de crescimento máximas da ordem de 0,2 d⁻¹ com *Rauwolfia sellowii* (Rech *et al.*, 1998), com *Dioscorea deltoidea* (Drapeau *et al.*, 1986) e com células de morango (Zhang *et al.*, 1998). Valores de μ_{\max} inferiores a 0,1 d⁻¹ foram obtidos por Zhong & Wang (1996) com *Panax notoginseng*, por Wang *et al.* (1999) com *Taxus chinensis* e por Archambault *et al.* (1996) com *Papaver somniferum* (0,06 d⁻¹).

Choi *et al.* (2000) obtiveram μ_{\max} de 0,0856 d⁻¹, muito próximo ao obtido neste trabalho em cultura de *Taxus chinensis* conduzidas em *shaker* e temperatura de 24°C, e Pan *et al.* (2000) descreveram que as células de *Taxus chinensis* cultivadas em bioreator aerado, apresentaram um μ_{\max} da ordem de 0,062 d⁻¹.

Em biorreator, a velocidade máxima de crescimento também varia. *Catharanthus roseus* e *Nicotiana tabacum* apresentaram μ_{\max} de 0,468 e 0,326 d⁻¹ (Van Gulik *et al.*, 1992). Jianfeng *et al.* (1998) obtiveram valores de μ_{\max} de 0,17 d⁻¹ em cultura de células de *Rhodiola sachlinensis* realizada em reator tipo *air lift*.

É necessário ficar claro que muitas das referências citadas neste texto utilizam o cultivo de células de plantas que vem sendo estudas sob os mais diversos enfoques, e muitas utilizam nos estudos linhagens produtoras e de bons potenciais de crescimento celular em meio líquido.

As curvas de consumo de carboidratos estão apresentadas nas Figuras 5.9, 5.10 e 5.11. As curvas mostram que a sacarose foi completamente hidrolisada em aproximadamente 7-8 dias de cultivo, entretanto, parte da sacarose foi hidrolisada por ação do calor no momento da autoclavagem nos meio sem quitosana. O mesmo

tempo de hidrólise da sacarose também foi verificado em cultivo de *Taxus Baccata* (Srinivasan *et al.*, 1995).

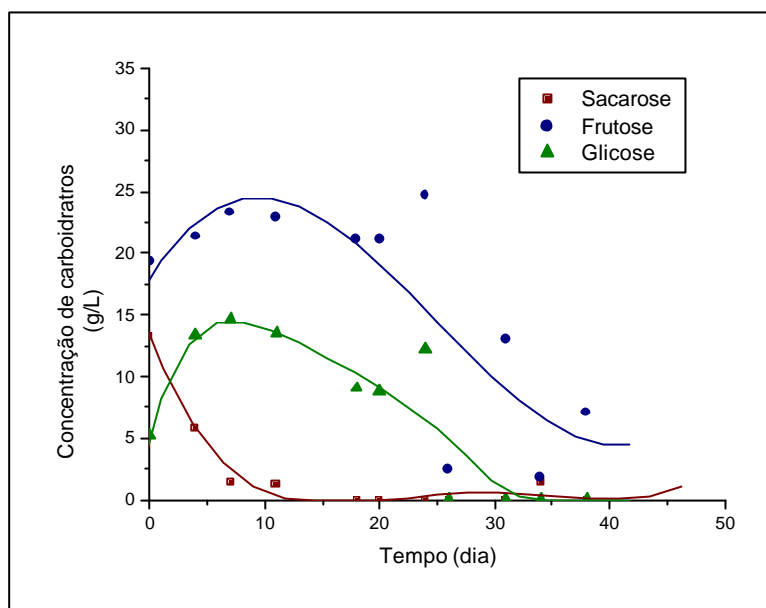


Figura 5.9 - Perfil do consumo de sacarose, glicose e frutose durante o cultivo de células de *P. hispidinervium* em meio MS37 em *shaker* com iluminação de 2500 Lux e fotoperíodo de 16 horas luz/dia.

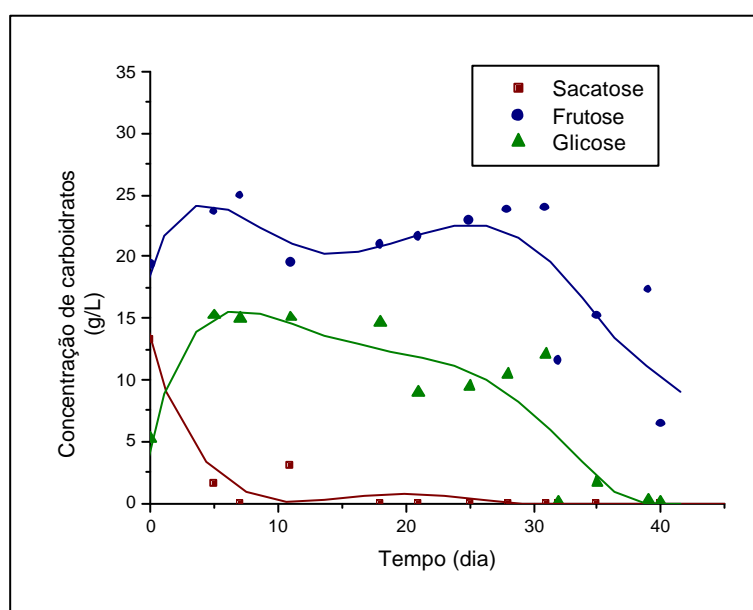


Figura 5.10 - Perfil do consumo de sacarose, glicose e frutose durante o cultivo de células de *P. hispidinervium* em meio MS37 em *shaker* no escuro.

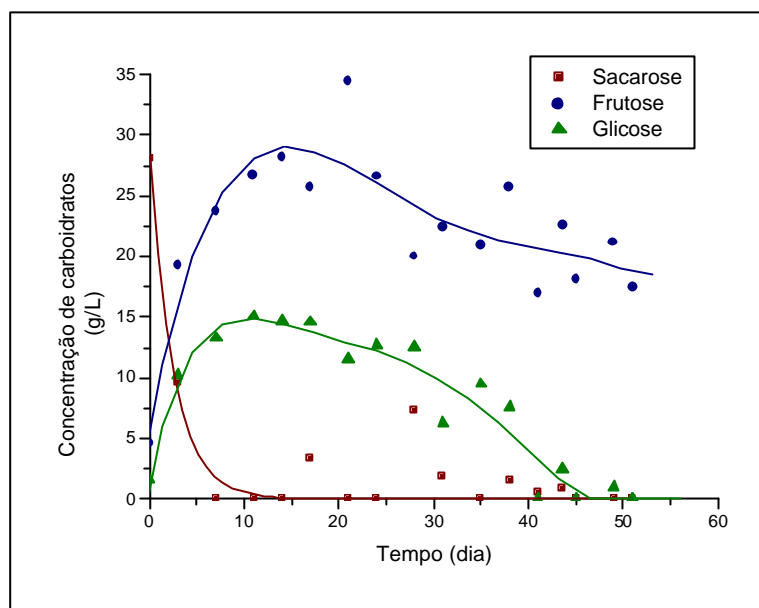


Figura 5.11 - Perfil do consumo de sacarose, glicose e frutose durante o cultivo de células de *P. hispidinervium* em meio MS37 com quitosana em *shaker* com iluminação de 2500 Lux e fotoperíodo de 16 horas luz/dia.

As células de pimenta longa hidrolisam a sacarose em glicose e frutose por meio de uma invertase extracelular e/ou ligada à parede celular (Martinez & Park, 1993). A concentração de frutose foi maior que a de glicose, sugerindo que a glicose é consumida mais rapidamente (Pareilleux & Vinas, 1983).

A hidrólise enzimática de sacarose e o preferencial consumo de glicose em culturas de células vegetais também foi observado em outras culturas de células de morango (Zhang *et al.*, 1998); de *Panax ginseng* (Zhang *et al.*, 1996); de cenoura (Fowler, 1982); de *Taxus baccata* (Hirasuna *et al.*, 1996; Srinivasan *et al.*, 1995), de *Taxus cuspidata* (Pestchanker *et al.*, 1996; Fett-Neto *et al.*, 1994), de *Dioscorea deltóidea* e *Catharanthus roseus* (Drapeau *et al.*, 1986).

Apesar da glicose se apresentar como o açúcar preferencial para as células de pimenta longa, durante o cultivo ocorre a absorção simultânea da frutose. Os perfis das curvas de consumo de carboidratos apresentados neste trabalho são semelhantes às apresentadas por Pépin *et al.* (1995) com células de *Vitis vinifera*.

Observa-se, nas Figuras 5.9, 5.10 e 5.11, que nas culturas de pimenta longa, a sacarose é hidrolisada completamente entre 7-10 dias de cultivo. Em células de morango esse tempo foi de 3-4 dias (Zhang *et al.*, 1998). Fowler (1982), observou em cultivos de células de cenoura, que a sacarose do meio foi hidrolisada rapidamente,

sendo que após 15 minutos do início do cultivo todo dissacarídeo tinha sido convertido em glicose e frutose, e Hong *et al.* (1989) reportou que essa conversão se dá no primeiro dia de cultivo.

No ensaio realizado em presença de quitosana observa-se que a hidrólise completa da sacarose ocorreu a partir do sétimo dia, sendo mais lenta em comparação com os demais ensaios. Uma hipótese para este fato é de que como a quitosana apresenta uma ação sobre a parede celular, pode estar afetando as enzimas localizadas na parede.

O consumo de glicose é mais rápido que o consumo de frutose levando a uma menor concentração de glicose no meio. A glicose desapareceu do meio a partir do 26º, 32º e 41º dias de cultivo nas culturas em MS37, MS37 no escuro e MS37 com quitosana, respectivamente. Nos três tratamentos, o consumo de frutose não se deu completamente para os tempos de cultivo.

O safrol foi detectado em algumas amostras analisadas como pode ser verificado no cromatograma apresentados em anexo (Anexo II). Os valores detectados são da ordem de 25 µg de safrol/ gms de célula. No ensaio com quitosana foi detectado uma concentração de safrol da ordem de 120 µg de safrol/ gms de célula.

As concentrações de safrol determinadas nas células de *Piper hispidinervium* cultivadas em meio líquido são muito baixa. Um ou mais fatores podem estar contribuindo para a reduzida formação deste composto *in vitro*. Dentre estes tem-se a concentração do inóculo, a qual pode ter efeitos benéficos para a produção de metabólitos secundários e para o crescimento celular quando se apresenta em concentrações mais elevadas (Chiou *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 1992). Nos ensaios aqui apresentados foi utilizado um inóculo (~1,0 gms/L) considerado de baixa concentração, que talvez possa ter sido insuficiente para que houvesse o estímulo da biossíntese em níveis maiores.

Os cultivos foram realizados com elevadas concentrações de auxina e citocinina, o que também pode estar atuando como inibidores da biossíntese de safrol. Alguns pesquisadores descrevem que o 2,4-D vem se comportando como um inibidor do metabolismo secundário (Dicosmos & Misawa, 1995; Fowler, 1984; Ramachandra & Ravishankar, 2002), apesar de favorecer um bom crescimento vegetal (Dörnemburg & Knorr, 1995). Neste sentido a produção de safrol poderia ser conduzida em dois estágios: um para a produção de células em que a concentração de reguladores de

crescimento poderia ser elevada e um segundo estágio em que poderia ser reduzida a concentração de reguladores de crescimento e, se for o caso, adicionar algum fator de estresse que pudesse contribuir para o aumento da produção de metabólitos secundários. A condução de processos de produção de metabólitos secundários em dois estágios tem sido estudada por diversos pesquisadores (Gao *et al.*, 2000; Sirois *et al.*, 2000), uma vez que, em muitos casos, as células requerem condições distintas para a proliferação celular e a síntese de metabólitos secundários (Payne *et al.*, 1988).

Uma grande parte dos metabólitos secundários é produzida na fase estacionária do crescimento celular, ou seja, apresentam uma relação inversa entre a velocidade de crescimento e o rendimento, como exemplo, tem-se a produção do taxano por *Taxus chinensis* (Wang *et al.*, 1999), do taxol por *Taxus cuspidata* (Fett-Neto *et al.*, 1994) e do ácido rosmarínico por *Coleus blumei* (Gertlowski & Petersen, 1993). Os cultivos de células de *Piper hispidinervium* não atingiram a fase estacionária de crescimento.

A utilização de quitosana como elicitor para a produção de safrol não favoreceu a produção do metabólito, apesar de ter sido detectado concentrações-traço nas células deste cultivo. Com *Marchantia polymorpha* cultivada em suspensão também não foi constatado o aumento da produção de ácidos graxos poliinsaturados (Chiou *et al.*, 2001). Entretanto, para o ensaio aqui apresentado, deve ser lembrado que existe uma soma de fatores, já citados, que podem estar impedindo a formação do safrol. Deve-se citar também que o fenômeno de elicitação pode ser dependente do estado fisiológico das células no momento da adição do composto (Bhagwath & Hjortso, 2000).

Uma observação feita ao comparar os cromatogramas (Figura 5.12) dos cultivos em meio sólido (calos) e os cultivos em meio líquido realizados em meio MS37, foi que em meio líquido ocorreu a formação de compostos com baixa polaridade, compostos estes não produzidos nas células dos calos.

Apesar de não ter sido detectada a formação de safrol nos cultivos, foi obtido um bom crescimento celular.

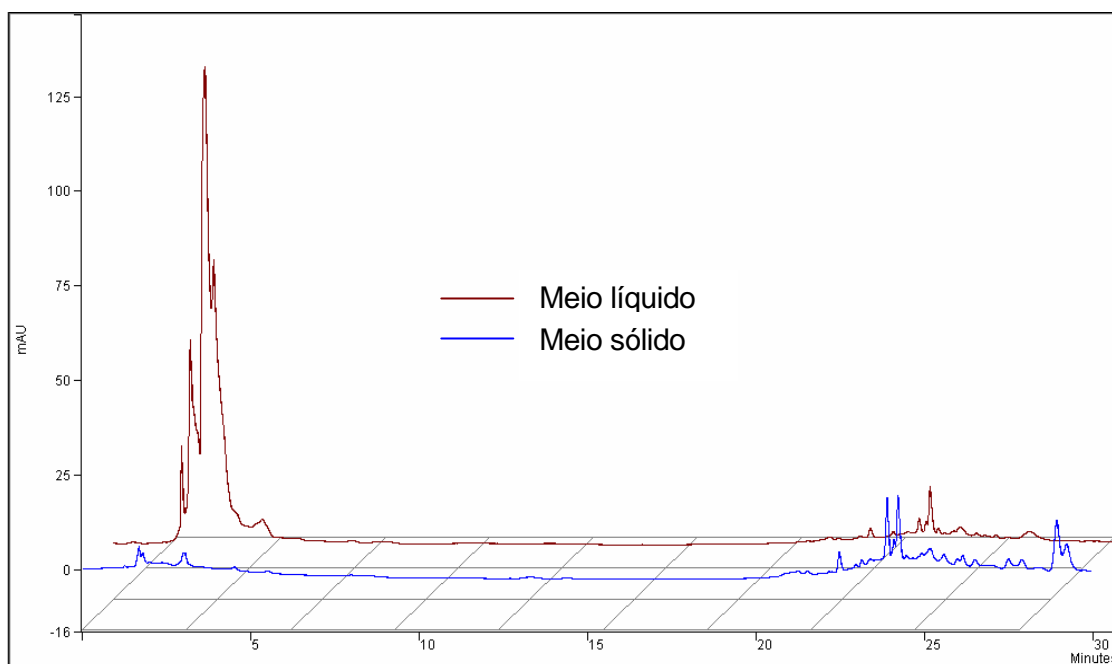


Figura 5.12 – Cromatograma do extrato das células de *Piper hispidinervium* cultivadas em meio sólido e em meio líquido MS37 sob luz.

5.4. ENSAIOS EM BIORREATORES

5.4.1. Ensaios em biorreator de balão de fundo chato

Os biorreatores construídos com balão de fundo redondo apresentaram graves problemas de contaminação, regulação de vazão de ar e sedimentação das células. A contaminação, muito provavelmente, se deve ao grande número de junções existentes no sistema e à deficiente vedação da junta de vidro. A regulação da vazão de ar de forma igualitária entre os reatores se dava de forma deficiente, tendo em vista que três reatores ficavam interligados e o ajuste não ocorria simultaneamente.

A deposição das células no fundo do biorreator se deu em função da baixa vazão de ar imposta, a qual foi ajustada, conforme literatura, em torno de 0,3 vvm, sendo esta muito baixa para obter uma distribuição uniforme das células através do meio líquido. Pestchanker *et al.* (1996) também tiveram problemas de homogeneização do sistema utilizando biorreator tipo-Wilson.

Foi observada a formação de uma deposição de células finas na parede do frasco próximo ao nível do meio de cultivo.

Em função dos problemas acima descritos, foi decidido por abandonar o uso deste tipo de biorreator.

5.4.2. Ensaios em biorreator de coluna de bolhas

Foram realizados cinco ensaios no biorreator em colunas de bolhas. Destes cinco ensaios dois contaminaram, dois ensaios foram realizados com células transferidas diretamente do meio sólido para o biorreator aerado (R1 e R2) e o último ensaio foi realizado com células pré-cultivadas em *shaker* durante 30 dias antes de serem inoculadas no reator (R3).

A densidade de inóculo dos ensaios R1 e R2 foram 45,5 e 32,5 gmu/L, ou 1,386 e 0,99 gms/L respectivamente.

No tratamento R1, observou-se que no início do processo havia a necessidade de impor uma velocidade de aeração de 0,3 vvm, aqui considerada elevada, e, segundo referências bibliográficas já citadas, esta aeração é máxima para cultura de células vegetais. A aeração de 0,3 vvm veio da necessidade da manutenção da homogeneidade do sistema, sendo que abaixo deste valor foi observada deposição das células sobre o aerador. Esse ensaio foi conduzido durante 15 dias e, nesse tempo, houve a necessidade de aumentar a vazão de ar imposta ao sistema para que as células não sedimentassem, porém esta não foi quantificada. Nesse ensaio foi observado que houve formação de massa celular, quantificada por meio de determinação de massa seca. O crescimento celular foi da ordem de 81 %, ou seja, a concentração de massa ao final do experimento foi de 7,63 gms/L. A produtividade em célula (P_x) no biorreator aerado foi de 0,416 g/dia, o que significa que o processo foi 19,1 % mais produtivo que o ensaio realizado em frasco agitado sob as mesmas condições de cultivo, exceto pela aeração do sistema e pela maior densidade inicial de célula.

Para poder reduzir a vazão volumétrica de aeração foi utilizada uma concentração menor de inóculo no ensaio R2. A vazão inicial de ar em que as células permaneciam em suspensão de forma uniforme foi de 0,077 vvm. Durante o cultivo, foi verificada a necessidade de aumentar a vazão com o tempo, devido à ocorrência de sedimentação das células. O aumento da vazão está demonstrado na Figura 5.13.

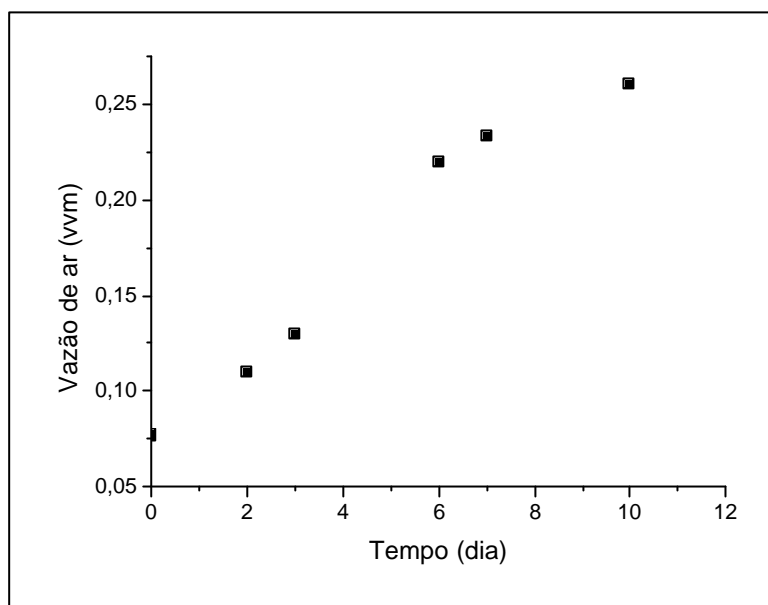


Figura 5.13 - Evolução do aumento da vazão de ar em cultivo de células de *Piper hispidinervium* em biorreator de coluna de bolhas com 500 mL de meio.

Visualmente, foi possível verificar que houve um aumento na quantidade de células e de aglomerados celulares no reator de coluna de bolhas, e, para que fossem mantidas em suspensão, foi necessário aumentar a vazão de ar comprimido, demonstrando que houve um aumento do diâmetro dos aglomerados celulares, uma vez que é sabido que o diâmetro de partícula é um dos parâmetros de maior interferência na fluidização de sistemas particulados.

O diâmetro da partícula pode variar devido a dois fatores, crescimento celular, que teria pouca interferência pela variação ser pequena, e formação de agregados celulares. A formação de agregados celulares advém da aglomeração de partículas (células), fato facilitado pela característica genética que as células vegetais apresentam de formar tecidos ou órgãos e, segundo Gomide (1983), em leitos fluidizados, o efeito de aglomeração de partículas aparece quando as partículas são menores que 30 μm . Como células vegetais podem apresentar uma variação de tamanho entre 10 e 100 μm materiais (Payne *et al.*, 1988), o efeito de aglomeração pode estar ocorrendo com células jovens, ou seja, que recém sofreram duplicação e apresentam tamanho reduzido. Desta forma, podemos considerar que está havendo formação de células e, conseqüentemente, de massa. O efeito da população determinado pela porosidade do meio é muito pequeno e pode ser desconsiderado. Como referência tem-se que os agregados celulares de *Taxus chinensis* se

apresentam maiores em biorreatores tipo *air lift* que em reatores mecanicamente agitados, devido ao menor cisalhamento provocado pela agitação pneumática (Pan *et al.*, 2000)

Diante desse resultado, pode-se afirmar que existe uma relação entre a vazão de ar necessária para fluidizar o sistema e o aumento dos agregados celulares. Esta constatação permite sugerir estudos hidrodinâmicos no sentido de estabelecer uma correlação que possa determinar a massa de células em função da vazão.

A determinação da correlação entre vazão de ar fornecida ao sistema e o crescimento celular viria a contribuir como um facilitador na determinação de parâmetros de processo, principalmente porque não haveria a necessidade de retirada de amostras durante o cultivo, o que diminuiria os riscos de contaminação, além de não interferir no volume total do reator.

Nos dois ensaios em que as células não sofreram um processo de adaptação em meio líquido, as células apresentaram um rápido escurecimento, passando de verde intenso para marrom nos 3-7 dias de cultivo. O aspecto das células, depois de separadas da porção líquida (meio de cultivo) por filtração, foi assemelhado a uma pasta, aspecto diferente das células quando cultivadas em frasco agitado, onde estas apresentaram uma textura granular e de coloração verde esbranquiçada. Houve dificuldade em realizar o processo de filtração o que sugeriu que as células poderiam estar rompidas. A coloração marrom e a consistência pastosa sugerem que podem ter havido rompimento e morte celular.

Duas hipóteses podem ser lançadas para explicar a morte das células nos cultivos realizados em biorreator de coluna de bolhas: uma é a toxicidade causada pela injeção de oxigênio em concentrações elevadas para as células de pimenta longa e, a segunda, se refere aos danos mecânicos das células devido à turbulência causada pela aeração forçada, levando à redução da viabilidade e ao acúmulo de fragmentos celulares. A primeira hipótese se vê enfraquecida ao consultar a literatura, onde se encontram ensaios realizados com taxas de aeração que variam de 0,2 a 1,5 vvm em que não se verifica a morte das células, apenas um decréscimo do crescimento celular Pareilleux & Vinas, 1983; Ducos e Pareilleux, 1986; Hegarty *et al.*, 1986. Jianfeng *et al.* (1998) verificou que uma aeração de 0,1 vvm imposta a uma cultura de células de *Rhodiola sachlinensis* realizada em reator tipo *air lift*, foi suficiente para manter valores de oxigênio dissolvido (DO) acima de 50% e promover um adequado suprimento de oxigênio para o crescimento das células. Todavia, a hipótese não pode

ser descartada por não se conhecer com clareza o comportamento de células de *P. hispidinervium* frente ao O₂.

Em estudos com *Catharanthus roseus*, foi verificado que o efeito inibitório da alta taxa de aeração sobre o crescimento não pareceu ser devido às elevadas concentrações de oxigênio, pois a mesma vazão foi testada com baixo conteúdo de oxigênio e apresentou o mesmo efeito (Hegarty *et al.*, 1986).

Como não houve um acompanhamento através de retiradas de amostras não é possível conhecer ao certo o comportamento das células, em que fase do crescimento estas se encontrava e dados sobre a viabilidade celular. Estes dados são de extrema relevância para a determinação do tempo de cultivo e a influência da aeração na viabilidade celular, além da determinação precisa dos parâmetros cinéticos de processo.

Por meio dos resultados apresentados pode-se afirmar que os cultivos em biorreator apresentam tempo de cultivo bastante reduzido em comparação com os ensaios em *shaker*.

Capítulo VI

Conclusões e Sugestões

6.1. CONCLUSÕES

Por meio dos experimentos realizados neste trabalho, pode-se determinar as concentrações de reguladores de crescimento adequadas para a formação de calo a partir de explantes de folhas de pimenta longa. Dentre os meios testados o meio MS37 apresentou superioridade na formação de massa, tendo demonstrando um índice de crescimento de 73,69 gmf de célula formada/ g de explante, 25,9% maior que o meio MS40, o segundo melhor. O meio MS37 produziu cerca de 8 vezes mais massa que o meio MC24, meio anteriormente proposto para a formação de calo de *Piper hispidinervium*. Desta forma, ficou estabelecido que a formação de massa celular fosse conduzida utilizando-se o meio MS37, o qual apresenta uma concentração hormonal elevada e um balanço pró citocinina (5,0 mg/L de 2,4D e 10,2 mg/L de BAP). A viabilidade celular do calo começa a decair a partir dos 45 dias após a inoculação, sendo adequado para a transferência para o meio líquido entre 35 e 45 dias.

Em meio líquido a maior formação de massa celular ocorreu com concentrações iniciais de sacarose de 30 g/L durante 30 dias de cultivo, atingindo uma concentração de célula de 10,7 gms/L e fator de conversão de 0,486 g de células/ g de sacarose. Concentrações de sacarose inferiores a 20 g/L foram consideradas limitantes e acima de 50 g/L inibidoras para o crescimento celular.

Utilizando meio MS37 com 30 g/L de sacarose foram determinadas as curvas de crescimento celular e de consumo de substrato, as quais demonstraram uma longa fase lag e cinética de crescimento exponencial. Apesar das velocidades específicas de crescimento da fase log não terem apresentado diferenças expressivas nos experimentos realizados em presença e ausência de luz, 0,78 e 0,77 d⁻¹, respectivamente, a produtividade ($P_x = 0,337$ gms/L.d), o fator de conversão ($Y_{x/s} =$

0,336 gms/g) e a concentração total de massa formada (13,8 gms/L) se mostraram superiores no ensaio realizado com intensidade luminosa de 2500 Lux.

Na literatura são encontrados valores para os parâmetros cinéticos variados para diversas espécies de plantas, o que dificulta uma avaliação precisa sobre o processo realizado neste trabalho, uma vez que não existem estudos dessa natureza com pimenta longa.

O ensaio com quitosana apresentou valores dos parâmetros cinéticos inferiores comparados aos dos demais ensaios, entretanto, foi o único ensaio em que foi constatada a presença de safrol nas células. O que indica que as células de pimenta longa necessitam de um estímulo, que pode ser um fator de estresse, para que as células produzam o metabólito de interesse.

A necessidade de um fator de estresse para a produção de safrol denota a necessidade da realização de cultivo de células de pimenta longa em dois estágios: um de produção de massa celular e outro de produção de safrol.

Foi observada uma diferença na produção de compostos (não conhecidos) das células cultivadas em meio líquido e em meio sólido, sendo necessário um processo investigativo sobre a natureza destes compostos.

Constatou-se que o tempo de cultivo com células provenientes diretamente do meio sólido, ou seja, sem o processo de adaptação no meio líquido por meio de pré-cultivo, pode ter sido insuficiente para que o metabólito secundário fosse formado, uma vez que o crescimento celular não atingiu o estado estacionário. A utilização de células pré-adaptadas viria a contribuir para a agilização do tempo de cultivo e redução da fase lag do crescimento celular.

As células de pimenta longa promovem a hidrólise da sacarose e apresentam um consumo preferencial de glicose em relação à frutose. As células em presença de quitosana hidrolisaram a sacarose mais lentamente, devido a uma provável ação que a quitosana exerce sobre a membrana celular.

Em biorreator, foi observado visualmente um crescimento celular e, a necessidade de aumentar a vazão de ar com o tempo de cultivo, demonstrando que houve aumento do diâmetro da partícula, ou seja, houve a formação de agregados celulares maiores durante o cultivo.

6.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ◆ Realização da introdução de elicitores em diferentes fases de crescimento a fim de identificar a melhor etapa de elicitação sem comprometer o crescimento celular.
- ◆ Realização de experimentos mais prolongados para determinar todos os estágios de crescimento celular de *Piper hispidinervium in vitro*.
- ◆ Realizar experimentos utilizando células pré-adaptadas ao meio líquido (pré-inóculo), de forma a reduzir a fase lag.
- ◆ Utilizar em meio líquido menores concentrações de reguladores de crescimento e substituir o ácido 2,4 diclofenoxiacético por outras auxinas para verificar se a baixa produção do metabólito está associada à inibição das células por parte deste composto, como é citado na literatura.
- ◆ Promover experimentos com maiores concentrações iniciais de células.
- ◆ Realização de ensaios em biorreator (coluna de bolhas) com células finamente divididas, ou seja, sem a presença de aglomerados, para facilitar a aeração e agitação sem a necessidade de vazões de ar elevadas.
- ◆ Promover ensaios em reatores mecanicamente agitados para verificar a sensibilidade ao cisalhamento da célula de pimenta longa.
- ◆ Realização de estudos hidrodinâmicos no sentido de estabelecer uma co-relação que possa determinar a massa celular em função da vazão de ar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKALEZI, C. O.; LIU, S.; LI, Q. S.; YU, J. T.; ZHONG, J. –J. Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspensio cultures of *Panax ginseng*. **Progress Biochemistry**, v. 34, p. 639-642, 1999.

ARNALDOS, T. L.; MUÑOZ, R.; FERRER, M. A.; CALDERÓN, A. A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x Ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 315-322, 2001.

A TARDE. Erva Daninha estudada pela Embrapa desperta interesse. Bahia, 05 de abril de 1999. Disponível em <http://jornal.atarde.com.br/99/arg04/ru0509.html> Acesso em: 05/02/2001.

ASADA, M.; SHULER, M. Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: effects of adsorption in situ, elicitors and alginate immobilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 475-482, 1989.

BARRUETO CID, L. P. Suspensão celular, **In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Serviço de produção de informação – SPI: Brasília, v. 1, p. 331-353, 1998.

BENEDITO, V. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 1, p. 33-38, 2000.

BHAGWATH, S. G.; HJORTSO, M. A. Statistical Analysis of elicitation strategies for thiarubrine A production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. **Journal of Biotechnology**, v.80, p. 159-167, 2000.

BOHLMANN, J.; GIBALTARSKAYA, E.; EILERT, U. Elicitor induction of furanocoumarin biosynthetic pathway in cell cultures of *Ruta graveolens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 43, p. 155-161, 1995.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161, p. 839-851, 2001.

BRODELIUS, P.; PEDERSEN, H. Increasing secondary metabolite production in plant-cell culture by redirecting transport. **Trends in Biotechnology**, v. 11, p. 30-36, 1993.

BRODELIUS, P.; FUNK, C.; HANER, A.; VILLEGAS, M. A procedure for determination of optimal chitosan concentrations for elicitation of cultured plant cells. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2651-2654, 1989.

BUITELAAR, R. M.; TRAMPER, J. Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. **Journal of Biotechnology**, v.23, p.111-141, 1992.

CARVALHO, N. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**, 2. ed Campinas: Fundação Cargill, 1988. 429 p.

CATAPAN, E.; OTUKI, M. F.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulatus* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 1, p. 25-34, 2001.

CHANG, H. N.; SIM, S. J. Extractive plant cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v.6, p.209-212, 1995.

CHATTOPADHYAY, S.; SRIVASTAVA, A. K.; BHOJWANI, S. S.; BISARIA, V. S. Production of podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 2, p. 215-220, 2002.

CHEN, F.; ZHONG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina plantensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 20, p. 221-224, 1997.

CHOI, H. K.; KM, S. J.; SON, J. S.; HONG, S. S.; LEE, H. S.; LEE, H. J. Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 593-598, 2000.

CHIOU, S. Y.; SU, W. W.; SU, Y. C. Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. **Journal of Biotechnology**, v. 85, p. 247-257, 2001.

Ciência Hoje. O jardim secreto das plantas, v. 19, n. 109, p. 59-62, 1995.

COLLINS-PAVAO, M.; CHIN, C.-K.; PEDERSEN, H. Taxol portioning in two-phase plant cell cultures of *Taxus brevifolia*. **Journal of Biotechnology**, v. 49, p. 95-100, 1996.

CONSTABEL, F. Plant cell culture. In: **Cryopreservation of plant cells and organs**. CRC Press: Florida, p. 1-12, 1985.

COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p.357-369.

DAVIES, P. J. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Kluwer Academic Publisher: Holanda, 679 p., 1987.

DE GUCHT, L. P. E.; VAN DER PLAS, L. H. W. Growth kinetics of glucose-limited *Petunia hybrida* cells in chemostat cultures: determination of experimental maintenance parameters. **Bioengineering and Biotechnology**, v. 46, p. 42-52, 1995.

DE-EKNAMKUL, W.; ELLIS, B. E. Effects of macronutrients on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. **Plant Cell Report**, v. 4, p. 46-49, 1985.

DICOSMOS, F.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternative for metabolite production, **In: Biotechnology Advances**. Pergamon: Grã Bretanha, v.13, n.3, p.425-453, 1995.

DO, C. B.; CORMIER, F. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. **Plant Cell Reports**, v.9, p. 143-146, 1990.

DÖRNEMBURG, H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 17, p. 674-684, 1995.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in Plant Tissue Culture**. 3rd ed. Cambridge University Press: Inglaterra, 256p., 1995.

DRAPEAU, D.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in batch culture. **Bioengineering and Biotechnology**, v. 28, p. 1555-1563, 1986.

DUCOS, J. P.; PAREILLEUX, A. Effect of aeration rate and influence of pCO₂ in large-scale cultures of *Catharanthus roseus* cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 101-105, 1986.

Embrapa/AC – Pimenta longa. **Centro de Informação de Pimenta longa**. Disponível em <http://www.embrapa.br/pimentalonga/faqs.htm>. Acesso em: 07/06/2001.

ERTOLA, R.J.; GIULIETTI, A. M.; CASTILLO, F. J. Design, formulation, and optimization of media. **In: Bioreactor System Design**. Marcel Dekker: Nova Iorque, p. 109-121, 1995.

ESHITA, S. M.; KAMALAY, J. C.; GINGAS, V. M.; YAUSSY, D. A. Establishment and characterization of American almond cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 245-249, 2000.

FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 473-476, 2001.

FETT-NETO, A. G.; ZHANG, W. Y.; DICOSMO, F. Kinetics of taxol production, growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. **Bioengineering and Biotechnology**, v. 44, p. 205-210, 1994.

FISCHER, U.; ALTERMANN, A. W. Cultivation of photoautotrophic plant cell suspension in bioreactor: influence of culture conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p. 19-28, 1995.

FLORES, R.; GOMES, P. R.; FARIA, J.; CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; PETERS, J. A. Calogênese in vitro de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria* X ananassa) a partir de discos foliares. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 1, p. 9-14, 1998.

FOWLER, M. W. Substrate utilization by plant-cell cultures. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 32, p. 338-346, 1982.

FOWLER, M. W. Plant cell culture: natural products and industrial application. In: **Biotechnology of Higher Plants**. Intercept: Reino Unido, p.107-158, 1988.

FRANKLIN, C. I.; DIXON, R. A. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: **Plant cell culture – a practical approach**, 2nd ed., IRL Press: Oxford, 1994.

GAGNON, H.; IBRAHIM, R. K. Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1463-1467, 1997.

GAO, W. Y.; FAN, L.; PAEK, K. Y. Yellow and red pigment production by cell cultures of *Catharanthus timctorius* in a bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, p. 95-100, 2000.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T. A. Plant hormones and plant growth regulator in plant tissue culture. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 32, p. 272-289, 1996.

GERTLOWSKI, C.; PETERSEN, M. Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension culture of *Coleus blumei*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 183-190, 1993.

GOMIDE, R. **Operações Unitárias: Operações com sistemas sólidos granulares**. Edição do autor: São Paulo, 293p., 1983.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. **In: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. ABCTP/EMBRAPA CNPH, Brasília, p. 203-212, 1990.

HAGENDOORN, M. J.; JAMAR, D. C. L.; MEYKAMP, B.; VAN DER PLAS, L. H. W. Cell division versus secondary metabolite production in *Morinda citrifolia* cell suspension. **Journal of Plant Physiology**, v. 150, p. 325-330, 1997.

HALAWEISH, F. T.; TALLAMY, D. W. Production of cucurbitacins by cell cultures. **Plant Science**, v. 131, p. 209-218, 1998.

HEGARTY, P. K.; SMART, N. J.; SCRAGG, A. H.; FOWLER, M. W. The aeration of *Catharanthus roseus* L. G. Don suspension cultures in airlift bioreactors: the inhibitory effect at high aeration rates on culture growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 37, n. 185, p. 1911-1920, 1986.

HIRASUNA, T. J.; PESTCHANKER, L. J.; SRINIVASAN, V.; SHULER, M. L. Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 95-102, 1996.

HONG, Y. C.; READ, P. E.; HARLANDER, S. K.; LABUZA, T. P. Development of a tissue culture system for immature strawberry fruits. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 388-392, 1989.

HORGAN, R. Cytokinins. In: **Advanced Plant Physiology**. Longman Scientific & Technical: New York, p. 53 - 63, 514p., 1990.

INGRAM, B.; MAVITUNA, F. Effect of bioreactor configuration on the growth and maturation of *Picea sitchensis* somatic embryo culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 87-96, 2000.

Jornal do Comércio. INPA descobriu que havia safrol na Pimenta longa. Recife, 28 de março de 1999. Disponível em <http://www2.uol.com.br/JC/1999/2903/cm2803b.htm> Acesso em 05/02/2001.

KANOKWAN, K.; DORAN, P. M. Effect of inoculum size on growth of *Antropa belladonna* hairy roots in shake flasks. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 4, p. 378-381, 1997.

KETCHUM, R. E. B.; GIBSON, D. M.; GALLO, G. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 185-193, 1995.

KIERAN, P. M.; MACLOUGHLIN, P. F.; MALNE, D. M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 39-52, 1997.

KNOBLOCH, K. H.; BAST, G.; BERLIN, J. Medium and light-induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 591-594, 1982.

KÖHLE, H.; YOUNG, D. H.; KAUSS, H. Physiological changes in suspension-cultured soybean cells elicited by treatment with chitosan. **Plant Science Letters**, v. 33, p. 221-230, 1984.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 51, p. 46-56, 1997.

KRIKORIAN, A. D.; KELLY, K.; SMITH, D. L. hormones in tissue culture and micropropagation. In: **Plant Hormones and their role in plant growth and development**. Kluwer Academic Publishers: Holanda, p. 593-613, 681 p., 1990.

KURATA, H. MATSUMURA, S. FURUSAKI, S. Light irradiation causes physiological and metabolic changes for purine alkslois production by *Coffea arabica* cell suspension culture. **Plant Science**, v. 123, p. 197-203, 1997.

JIANFENG, X; JIAN, X.; AIMING, H.; PUSUN, F.; ZHIGUO, S. Kinetic and technical studies on large-scale culture of *Rhodiola sachalinensis* compact callus aggregates with air-lift reactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 72, p. 227-234, 1998.

LEE, C. W. T.; SHULER, M. L. The effect of inoculum density and conditioned mediom on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, n. 1, p. 61-71, 2000.

LEOPOLD, A. C.; KIEDEMANN, P. E. **Plant Growth and Development**. 2nd ed., McGraw Hill: EUA, 545p., 1975.

LINDEN, J. C.; PHISALAPHONG, M. Oligosaccharides potentiate methyl jasmonate-induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis*. **Plant Science**, v. 158, p. 41-51, 2000.

LIU, C.; KWANHOON, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Enhanced regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic callus by lighth irradiation in growth phase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 3, p. 319-321, 2001.

MARTIN, A. B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGGO, P., HITA, O.; MARTÍN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugar, reducing

sugar, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Madicago arborea* L. **Plant Science**, v. 154, p. 143-151, 2000.

MARTINEZ, B. C.; PARK, C., -H. Characteristics of batch suspension cultures of preconditioned *Coleu blumei* cells: sucrose effect. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 97-100, 1993.

MAVITUNA, F.; BUYUKALACA, S. Samatic embryogenesis of pepper in bioreactors: a study of bioreactor type and oxigen-uptake rates. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 46, p. 327-333, 1996.

MERILLON, J. M.; RIDEAU, M.; CHENIEUX, J. C. Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine and triptamine in *Catharanthus roseus* cells *in vitro*. **Planta Medica**, v. 50, n. 6, p. 497-501, 1984.

MISAWA, M. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolite, 1994. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0831e/t0831e00.htm>. Acesso em 04/09/2001.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, p. 371-394, 1949.

MORALES, C. F. G.; LOMBARDI, S. R. B.; SOARES, P. F.; FORTES, G. R. L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 3, p. 174-177, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, M.N. **Protocolo de avaliação isoenzimática para a Pimenta longa (*Piper hispidinervium*)**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n.12, dez/1998, 4p. (Série Instruções Técnicas).

OLTRAMARI, A. C. **Engenharia de metabolismo de células de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer): análise da produção de biomassa celular e da síntese de safrol**. 2002. 123f.. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLTRAMARI, A. C.; DUARTE DA SILVA, J. M. O.; PASSOS, R.; PEDROTTI, E. L.; MARASCHIN, M. Análise histórica e de mercado da atividade extrativista da biomassa lignocelulósica e do óleo essencial de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (vell.) Rohwer) no estado de Santa Catarina. In: **Anais III Jornada Catarinense de Plantas Medicinais**. P. 99, 2001.

PAERCE, G.; MARCHAND, P. A.; GRISWOLD, J.; NORMAN, G. L.; RYAN, C. A. Accumulation of feruloyltyramine and p-coumaroyltyramine in tomato leaves in response to wounding. **Phytochemistry**, v. 47, n. 4, p. 659-664, 1998.

PAYNE, G. F.; PAYNE, N. N.; SHULER, M. L. Bioreactor considerations for secondary metabolite production from plant cell tissue culture: indole alkaloids from *Catharanthus roseus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 905-912, 1988.

PAN, Z. –W.; WANG, H. –Q.; ZHONG, J. –J. Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cell for production of taxane diterpene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 714-723, 2000.

PANDA, A. K.; SAROJ, M.; BISARIA, V. S. Alkaloid production by plant cell suspension cultures of *Holarrhena antidysenterica*: I. Effect of major nutrients. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 1043-1051, 1992.

PAREILLEUX, A.; VINAS, R. Influence of the aeration rate on the growth yield in suspension culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Journal of Fermentation Technology**, v. 61, n. 4, p. 429-433, 1983.

PASSOS, L. P. **Métodos Analíticos e Laboratoriais em Fisiologia Vegetal**. EMBRAPA – CNPGL: Coronel Pacheco, MG, 1996, 223p.

PÉPIN, M. –F.; SMITH, M. A. L.; REID, J. F. Application of imaging tools to plant cell culture: relationship between plant cell aggregation and flavonoid production. **In vitro Cellular Development Biology**, v. 35, p. 290-295, 1999.

PÉPIN, M. –F.; ARCHAMBAUT, J.; CHAVARIE, C.; CORNIER, F. Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures: I. Shake flask cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, -. 131-138, 1995.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P.S.; MAAS, C.H.; REBELO, R.A.; GIOTTO, C.R.; WENDHAUSEN JR., R.; LARGURA, G. e TAVARES, L.B.B. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta longa. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 15, p. 18-23, 2000.

PESTCHANKER, L. J.; ROBERTS, S. C.; SHULER, M. L. Kinetics of taxol production and nutrients use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and Wilson-type biorreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 256-260, 1996.

PIMENTEL, F.A.; ROCHA, W. B.; CABRAL, W.G. **Colheita, beneficiamento e armazenamento de sementes de pimenta longa (*piper hispidinervium*)**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n.20, out/1999. 2p. (Série Instruções Técnicas).

PINHO DE SÁ, C.; PIMENTEL, F.A.; CABRAL, W.G.; SILVA, M.R.; PINHEIRO, P.S.N.; BEZERRA, A.L. **Coeficientes técnicos e custos para exploração da Pimenta longa**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n.8, nov/1998, 2p. (Série Instruções Técnicas).

PITTA-ALVAREZ, S. I.; GIULIETTI, A. M. Influence of chitosan, acetic acid and citric acid on growth and tropane alkaloid production in transformed roots of *Brugmansia candida* – Effect of medium pH and growth phase. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 59, p. 31- 38, 1999.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. Em http://www.biotecnologia.com.br/4hp_4.htm. Acessado em 26/04/2000.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites, **Biotechnology Advances**, v.20, p. 101-153, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN S. E. **Biologia Vegetal**. 2ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 728p., 1996.

RECH, S. B.; BATISTA, C. V. F.; SCHRIPSEMA, J.; VERPOORTE, R.; HENRIQUES, A. T. Cell cultures of *Rauwolfia sellowii*: growth and alkaloid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 61-63, 1998.

ROCHA, S.F.R.; MING, L.C. *Piper hispidinervium* C.DC.(Piperaceae) - Uma fonte sustentável de safrol. Disponível em http://www.sne.org.br/congresso/resumos/desenvolvimento_sustentavel/68.htm
Acesso em 05/02/2001.

ROSA, F.A.F.; NASCIMENTO, M.G.; REBELO, R.A.; PESCADOR, R. Avaliação da atividade regulatória de crescimento de compostos análogos ao ácido indolacético em sementes de alface. In: 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. **Livro de Resumos**, v.2, QB-010, Poços de Caldas, 2000.

RYU, D. D. Y.; LEE, S. O.; ROMANI, R. J. Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. **Bioengineering and Biotechnology**, v. 35, p. 305-311, 1990.

SAJC, L. GRUBISIC, D.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Bioreactors of plant engineering: an outlook for further research. **Biochemical Engineering**, v. 4, p. 89-99, 2000.

SAKURAI, M.; OZEKI, Y.; MORI, T. Induction of anthocyanin accumulation in rose suspension-cultured cells by conditioned medium of strawberry suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 50, p. 211-214, 1997.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology** 4th ed. Wadsworth Publishing Company: EUA, 682p., 1992.

SATO, K.; NAKAYAMA, M.; SHIGETA, J. Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. **Plant Science**, v. 113, p. 91-98, 1996.

SCRAGG, A. The immobilization of plant cells. **In: Plant Cell and Tissue Culture**. Wiley: New York, p. 205-219, 1991.

SCRAGG, A. H.; YORK, A. A.; BONDON, P.; SARKISSIAN, G. S.; GREY, D. Growth of *catharanthus roseus* suspensions for maximum biomass and alkaloid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 292-298, 1990.

SELLÉS, M.; BERGOÑÓN, S.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C. Effect of sucrose on growth and galanthamine production in shoot-clump cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 129-136, 1997.

SIROIS, J.; PERRIER, M.; ARCHAMBAULT, J. Development of two-step segregated model for the optimization of plant cell growth. **Control Engineering Practice**, v. 8, p. 813-820, 2000.

SRINIVASAN, V.; PESTCHANKER, L.; MOSER, S.; HIRASUNA, T.; TATICEK, R. A.; SHULER, M. L. Taxol production in biorreactors: kinetics of biomass accumulation, nutrient uptake, and taxol production by cell suspension of *Taxus baccata*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, p. 666-676, 1995.

STAFFORD, A. Natural products and metabolites from plants and plants tissue culture. **In: Plant Cell and Tissue Culture**. Wiley: New York, p. 124-162, 1991.

STYER, D. J. Bioreactor technology for plant propagation. **In: Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A. (eds.). Basic Life Science, v. 32. Plenum Press: New York. p. 117-130, 390 p., 1985.

SU, W. W. Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 50, p. 189-230, 1995

TAGLIACOZZO, G. M. D.; COSTA, A. M. M. Fitormônio e seus efeitos biológicos *in vivo* e *in vitro*. In: **Micropropagação de plantas ornamentais**. IAC: Campinas, n. 174, p. 58-62, 1998 (Boletim técnico).

TANAKA, H.; SEMBA, H.; JITSUFUCHI, T.; HARADA, H. The effect of physical stress on plant cells in suspension cultures. **Biotechnology Letters**, vol. 10, n. 7, p. 485-490, 1988.

TAKAEDA, T. TAKEUCHI, Y.; SEKI, M.; FURUSAKI, S.; MATSUOKA, H. kinetic analysis of cell growth and vitamin E production in plant cell culture of *Carthamus tinctorius* using a structured model. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1, p. 233-242, 1998.

TATICEK, R. A.; MOO-YOUNG, M.; LEGGE, R. L. Effect of bioreactor configuration on substrate uptake by cell suspension cultures of the plant *Eschscholtzia californica*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 33, p. 280-286, 1990.

TATICEK, R. A.; MOO-YOUNG, M.; LEGGE, R. L. The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 24, p. 139-158, 1991.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S. Fitormônios. **Universa**, v.8, n.1, p.101,132, 2000.

TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas, In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Serviço de produção de informação – SPI: Brasília, v. 1, p. 11-20, 1998.

VAN DEN BERG, A. J. J.; RADEMA, M. H.; LABADIE, R. P. Effect of light on anthraquinona production in *Rhamnus purshiana* suspension culture. **Phytochemistry**, v. 27, n. 2, p.415-417, 1988.

VAN GULIK, K. M.; NUUTILA, A. M.; VINKE, K. L.; TEN HOOPEN, H. J. G.; HEIJNEN, J. J. Effect of carbon dioxide, air flow rate, and inoculation density on the batch growth of *Catharanthus roseus* cell suspension in stirred fermentors. **Biotechnology Progress**, v. 10, p. 335-339, 1994.

VAN GULIK, K. M.; TEN HOOPEN, H. J. G.; HEIJNEN, J. J. Kinetics and stoichiometry of growth of plant cell cultures of *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum* in batch and continuous fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 863-874, 1992.

VERPOORTE, R. Secondary metabolism. **In: Metabolic engineering of plant cells.** Kluwer: Holanda, p. 1-29, 2000.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; TEN HOOPEN, H. J. G.; MEMELINK, J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathway for the production of fine chemicals. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 467-479, 1999.

WANG, H. Q.; YU, J. T.; ZHONG, J. —J. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by feeding strategy. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 479-483, 1999.

WEN, Z. —Y.; ZHONG, J. —J. Effect of initial phosphate concentration on physiological aspects of suspension cultures of rice cells: a kinetic study. **Journal of Fermentation and Technology**, v. 83, n. 4, p. 381-385, 1997.

WILLIAMS, R. D.; BÉDARD, C.; CHAVARIE, C.; ARCHAMBAULT, J. Production of sanguinarine by plant cell culture II. Further nutritional aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 46, p. 107-120, 1996.

WILSON, P. D. G.; HILTON, M. G. Plant cell bioreactors. **In: Bioreactor System Design.** Marcel Dekker: Nova Iorque, p. 413 - 439, 1995.

WU, J.; ZHONG, J. J. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technology and applied aspects. **Journal of Biotechnology**, v.6, p.209-212, 1999.

YEOMAN, M. M.; YEOMAN, C. L. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. **New Phytologist**, v. 134, p. 553-569, 1996.

YOSHIKAWA, M.; YAMAOKA, N.; TAKEUCHI, Y. Elicitors: their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. **Plant Cell Physiology**, v. 34, n. 8, p. 1163-1173, 1993.

ZHANG, Y. -H.; ZHONG, J. -J.; YU, J. -T. Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of sucrose. **Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 49-56, 1996.

ZHANG, W.; SEKI, M.; FURUSAKI, S.; MIDDELBERG, A. P. J. Anthocyanin synthesis, growth and nutrient uptake in suspension cultures of strawberry cells. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 72-78, 1998.

ZHAO, J.; ZHU, W. H.; HU, Q. Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 666-672, 2001 (a).

ZHAO, J.; ZHU, W. H.; HU, Q. Enhanced catharanthine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 673-681, 2001 (b).

ZHONG, J. -J.; YOSHIDA, T. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: effects of sucrose concentration and inoculum size. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 1073-1079, 1995.

ZHONG, J.-J.; YU, T. -T.; YOSHIDA, T. Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 461-467, 1995.

Anexo I

Composição do meio MS

Neste anexo está apresentada a composição e concentrações de sais do meio Murashige & Skoog (1962).

Este meio foi selecionado como meio basal para a execução deste trabalho por ser este um dos meios mais utilizados e citados na literatura e por já ter sido utilizado no cultivo de células de pimenta longa no Laboratório de Biotecnologia e Micropropagação Vegetal da Universidade Regional de Blumenau.

Na Tabela A1 está demonstrada a concentração mássica e molar do meio MS.

Tabela A1 – Composição mássica e molar do meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

Constituinte	Concentração no meio de cultura (mg/L)	Molaridade no meio de cultura
Macro nutrientes		
NH ₄ NO ₃	1650	2,06 x 10 ⁻²
KNO ₃	1900	1,88 x 10 ⁻²
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	3,00 x 10 ⁻³
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	1,50 x 10 ⁻³
KH ₂ PO ₄	170	1,25 x 10 ⁻³
Elementos traço		
KI	0,83	5,00 x 10 ⁻⁶
H ₃ BO ₃	6,2	1,00 x 10 ⁻⁴
MnSO ₄ . 4H ₂ O	8,6	9,99 x 10 ⁻⁵
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25	2,00 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	1,00 x 10 ⁻⁶
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025	1,00 x 10 ⁻⁷
		1,00 x 10 ⁻⁷
Fonte de ferro		
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8	1,00 x 10 ⁻⁴
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	37,3	1,00 x 10 ⁻⁴
Suplementos orgânicos		
Mio-inositol	100	4,90 x 10 ⁻⁴
Ácido nicotínico	0,5	4,66 x 10 ⁻⁶
Piridoxina – HCL	0,5	2,40 x 10 ⁻⁶
Tiamina	0,1	3,00 x 10 ⁻⁷
Glicina	2,0	3,00 x 10 ⁻⁵
Fonte de carbono		
Sacarose	30.000	8,80 x 10 ⁻²

Fonte : Franklin & Dixon (1994).

Para o preparo do meio de cultura foram feitas soluções estoques segundo Franklin & Dixon (1994). As soluções foram armazenadas em geladeira até seu uso, com exceção das vitaminas, as quais eram separadas em alíquotas de 5 ou 10 mL e armazenadas em freezer.

Anexo II

Determinação gráfica dos parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos de cada cultura foi realizada utilizando o método gráfico de regressão linear, sendo a velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) calculada por meio do coeficiente angular da reta linearizada do gráfico de Ln da concentração celular (massa seca) X tempo e o fator de conversão de substrato em célula foi determinado também pelo coeficiente linear da reta linearizada do gráfico da concentração celular (massa seca) x concentração de carboidratos totais.

As Figura All 1 e All 2 demonstram a determinação de $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$ do cultivo MS37 sob intensidade luminosa de 2500 Lux, as Figuras All 3 e All 4 do cultivo no escuro e as Figura All 5 e All 6 com quitosana.

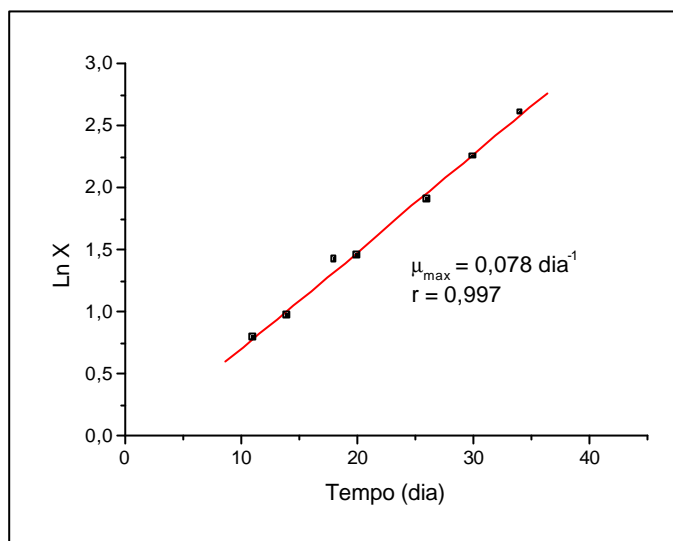


Figura All 1 – Determinação da velocidade específica máxima de crescimento de células de *P. hispidinervium* cultivadas em meio MS37 sob agitação de 100 rpm e iluminação de 2550 Lux e fotoperíodo de 16 horas de luz/dia.

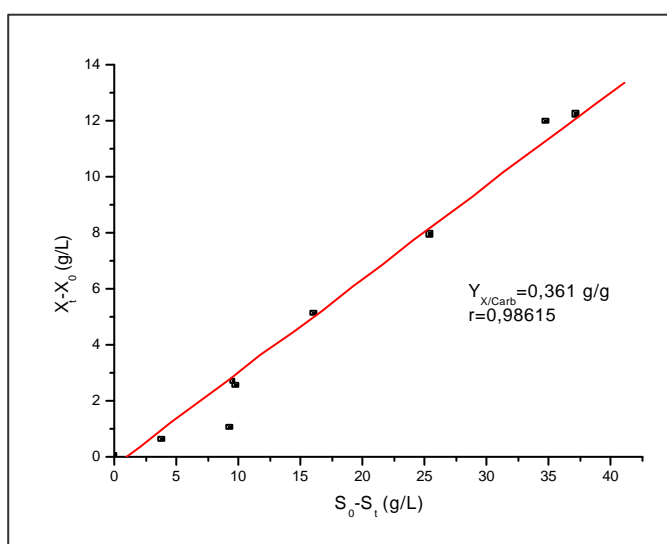


Figura All 2 – Determinação do fator de conversão de carboidratos totais em células de *P. hispidinervium* cultivadas em meio MS37 sob agitação de 100 rpm e iluminação de 2550 Lux e fotoperíodo de 16 horas de luz/dia.

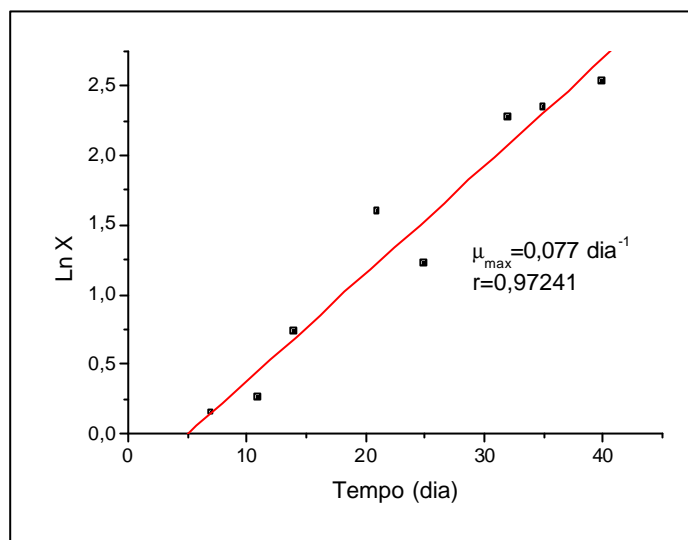


Figura AII 3 – Determinação da velocidade específica máxima de crescimento de células de *P. hispidinervium* cultivadas em meio MS37 sob agitação de 100 rpm e no escuro.

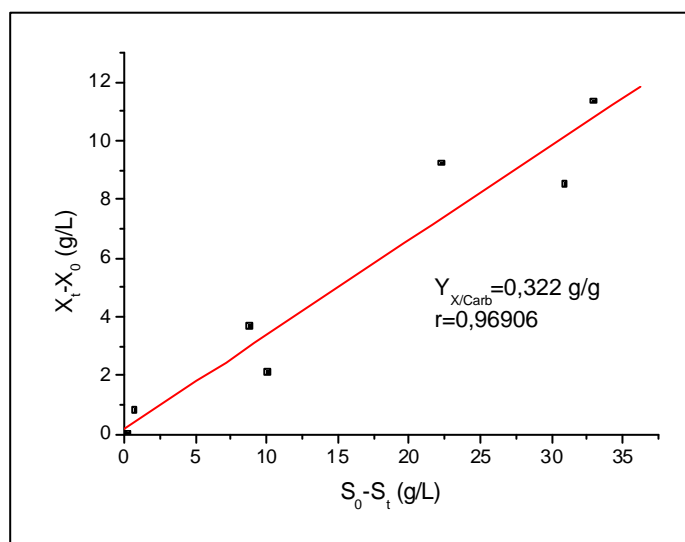


Figura AII 4 – Determinação do fator de conversão de carboidratos totais em células de *P. hispidinervium* cultivadas em meio MS37 sob agitação de 100 rpm e no escuro.

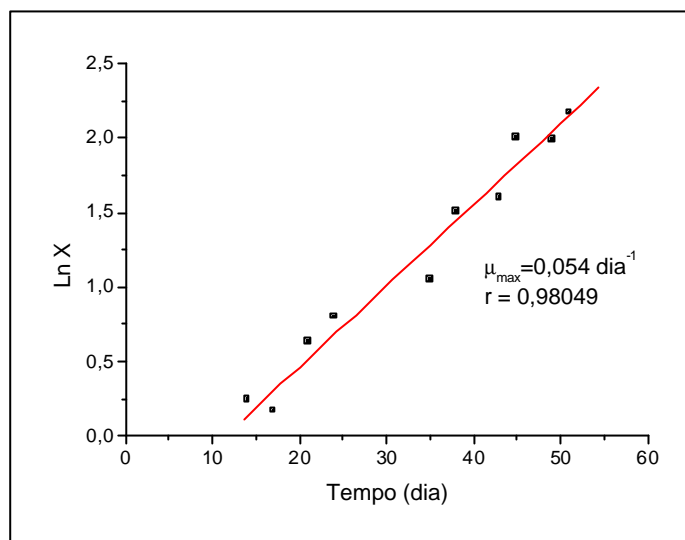


Figura AII 5 – Determinação da velocidade específica máxima de crescimento de células de *P. hispidinervium* cultivadas em meio MS37 com adição de quitosana, sob agitação de 100 rpm e iluminação de 2550 Lux e fotoperíodo de 16 horas de luz/dia.

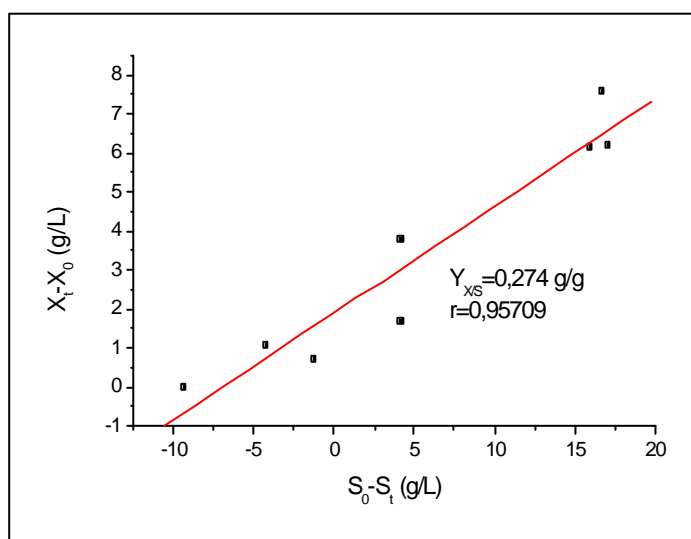


Figura AII 6 – Determinação do fator de conversão de carboidratos totais em células de *P. hispidinervium* cultivadas em meio MS37 com adição de quitosana, sob agitação de 100 rpm e iluminação de 2550 Lux e fotoperíodo de 16 horas de luz/dia.